



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

## **Identificació de vectors i hostes potencials de *Xylella fastidiosa* a diferents àrees fructícoles i vinícoles de Catalunya**

Treball final de grau

Enginyeria de sistemes biològics

Autor: Jonatan Ortega Lazaro

Tutor: César Ornat

Tutor IRTA: Assumpció Batlle

Juliol / 2016

## Resum

*X. fastidiosa* és un bacteri gramnegatiu que afecta el xilema de les plantes, no té tractament curatiu i pot afectar més de 300 espècies vegetals, la seva progressió és extremadament ràpida podent matar en setmanes vinyes, oliveres, ametllers, cítrics i fruiters de pinyol entre d'altres conreus llenyosos. Les úniques eines de control de les que es disposa a dia d'avui, giren entorn a prevenir-ne la infecció a través de mesures sobre els insectes transmissors. S'ha identificat com a vector principal del bacteri a Itàlia l'insecte *Philaenus spumarius*. Davant la aparició d'un gran focus fora de control de *X. fastidiosa* en olivera al sud d'Itàlia per primera vegada a Europa, i la seva molt probable arribada a Catalunya en un futur pròxim, tot coneixement sobre aquest insecte esdevé cabdal per a minimitzar-ne els danys i la dispersió un cop arribi. Durant la elaboració del treball, s'ha dut a terme, la identificació dels possibles vectors potencials del bacteri a la península ibèrica, s'han analitzat diferents mostres vegetals de diferents zones de Catalunya, a més de tots els vectors capturats, mitjançant la tècnica PCR, per descartar que siguin portadors del bacteri. D'altra banda s'ha realitzat un seguiment de la dinàmica poblacional de *P.spumarius* i un llistat dels hostes silvestres en els que s'han trobat nius d'aquest vector. Les conclusions extretes del treball realitzat són la identificació de cinc possibles vectors del bacteri a la península, la confirmació de que el bacteri no hi es present a la prospecció, l'estudi de la dinàmica poblacional de *P.spumarius*, els principal hostes d'aquest i l'evidència del perill de disseminació del bacteri en cas de que fos introduït.

## Resumen

*X. fastidiosa* es una bacteria gramnegativa que afecta el xilema de las plantas, no tiene tratamiento curativo y puede afectar a más de 300 especies vegetales, su progresión es extremadamente rápida pudiendo matar en semanas viñas, olivos, almendros, cítricos y frutales de hueso entre otros cultivos leñosos. Las únicas herramientas de control de las que se dispone a día de hoy, giran en torno a prevenir la infección a través de medidas sobre los insectos transmisores. Se ha identificado como vector principal de la bacteria en Italia el insecto *Philaenus spumarius*. Ante la aparición de un gran foco fuera de control de *X. fastidiosa* en olivo en el sur de Italia por primera vez en Europa, y su muy probable llegada a Cataluña en un futuro próximo, todo conocimiento sobre este insecto se convierte en primordial para minimizar los daños y la dispersión una vez llegue. Durante la elaboración del trabajo, se ha llevado a cabo, la identificación de los posibles vectores potenciales de la bacteria en la Península Ibérica, se han analizado diferentes muestras vegetales de diferentes zonas de Cataluña, además de todos los vectores capturados, mediante la técnica PCR, para descartar que sean portadores de la bacteria. Por otro lado se ha realizado un seguimiento de la dinámica poblacional de *P. spumarius* y un listado de huéspedes silvestres en los que se han encontrado nidos de este vector. Las conclusiones extraídas del trabajo realizado són la identificación de cinco posibles vectores de la bacteria en la península, la confirmación de que la bacteria no está presente en la prospección, el estudio de la dinámica poblacional de *P. spumarius*, los principales huéspedes de este y la evidencia del peligro de diseminación de la bacteria en caso de ser introducida.

## Abstract

*X. fastidiosa* is a gram-negative bacterium that affects plants' xylem, it has no curative treatment and it may affect over 300 plant species. Its progression is extremely rapid and may kill vineyards, olive and almond trees, citruses and some fruit trees among many other species within a few weeks. Nowadays, the only available tools for controlling it are based on preventing its infection with measures on the transmitting insects. The insect *Philaenus spumarius* has been identified as the bacterium's main vector. The first outbreak out of control of *X. fastidiosa* in Europe in the south of Italy and its more than likely arrival to Catalonia in the near future make the study of this insect even more important in order to minimize damage and once it gets here. In devising this project, the following structure has been applied: identifying the main potential vectors of this bacterium in the Iberian Peninsula, analyzing the different plant samples from different parts from Catalonia, as well as the main vectors that have been found with the PCR technique in order to rule out the fact that they might be already transmitting the bacterium. On the other hand, the population dynamics of the *P.spumarius* and a list of hosts in the wild ness have also been monitored and new vectors have been found. To sum up, the conclusions of this project include identifying the five bacterium's main possible vectors in the Peninsula, confirming that the bacterium is not found during the exploration, studying the population dynamics of the *P.spumarius*, its five main hosts and the evidence of the danger of its spreading in case of arriving here.

## Agraïments

En primer lloc, vull agrair a la meva directora del Treball de Final de Grau Assumpció Batlle totes les hores d'atenció, assessorament i seguiment que m'ha dedicat al llarg de tots aquests mesos. Gràcies per deixar-me formar part d'aquest projecte i per haver-me ensenyat tant.

En segon lloc, volia agrair enormement l'ajuda que m'ha ofert en tantes pràctiques de laboratori. El Dr. Jordi Sabaté. Moltíssimes gràcies per totes les extraccions i PCRs que vas fer amb mi. Gràcies per l'assessorament en totes les tècniques de laboratori que s'han fet en tots els assajos, he après moltíssim i has estat el millor company que podria demanar.

També volia agrair al meu tutor universitari César Ornat per l'interès constant que ha mostrat i l'assessorament que m'ha proporcionat durant tots els mesos que he estat realitzant el treball.

Finalment, volia agrair a tot l'equip de tècnics de l'IRTA per tota la seva ajuda de treball de camp i de laboratori.

## Sumari

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>8</b>
1.1. Introducció general	8
1.1.1. Olivera	9
1.1.2. Vinya	10
1.2. Bacteri	12
1.2.1. Situació a Europa	14
1.2.2. Transmissió de <i>X.fastidiosa</i>	16
1.3. Vectors	17
<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>19</b>
3.1. Captura d'insectes	19
3.2. Extracció d'ADN per detecció del bacteri en plantes i insectes amb tampó CTAB	22
3.3. Realització de la PCR per a la detecció del bacteri	24
3.3.1. PCR de punt final o clàssica	24
3.3.2. PCR Real-Time o PCR a temps real	27
<b>4. RESULTATS</b>	<b>31</b>
4.1. Objectiu 1: Identificació de vectors potencials del bacteri en àrees fructíferes i vinícoles del nord i nord-est de la península	31
4.2. Objectiu 2: Anàlisi dels vectors mitjançant PCR per descartar que siguin portadors del bacteri	37
4.3. Objectiu 3: Realització d'una prospecció en cultius d'olivera, vinya, jardins, centres de jardineria i vivers de plantes ornamentals, tant d'espècies que poden mostrar símptomes com d'altres que puguin ser hostes del bacteri i a vegades asimptomàtiques com <i>Polygala myrtifolia</i> , <i>Spartium junceum</i> i <i>Nerium oleander</i> , entre d'altres	40
4.4. Objectiu 4: Dinàmica poblacional de <i>Philaenus spumarius</i> i identificació de plantes silvestres que puguin ser hostes d'aquest insecte	42
<b>5. DISCUSSIÓ</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSIONS</b>	<b>47</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>48</b>
<b>8. ANNEXES</b>	<b>53</b>
8.1. Annex A. Sèrie de dades experimentals	53

Identificació de vectors i hostes potencials de <i>Xylella fastidiosa</i> a diferents àrees fructícoles i vinícoles de Catalunya.	7
8.2. Annex B. Programa d'ajust Graus-Dia.....	65
8.3. Annex C. Figures .....	67
9. ÍNDEX FIGURES .....	74
10. ÍNDEX TAULES .....	77

# 1. Introducció

## 1.1. Introducció general

*Xylella fastidiosa* causa greus malalties en cultius com olivera, vinya, ametller i cítrics, tots ells presents al mediterrani i a l'interior del territori espanyol.

La importància econòmica i social del cultiu de la vinya i l'olivera a l'Estat Espanyol és enorme, situada al capdamunt dels països Europeus a nivell de producció i hectàrees cultivades. La recent aparició de el bacteri a Europa ha causat una gran alerta a tot el continent i ha mobilitzat tots el organismes encarregats del control sanitari dels vegetals. Per això, a l'IRTA es realitza aquest projecte sobre *Xylella fastidiosa*, amb la finalitat de tenir coneixements previs sobre el bacteri, abans de que arribi a la península, ja que degut a la situació geogràfica i les condicions climàtiques, té una alta probabilitat de que el bacteri prolifere al territori com s'indica a la figura 1.

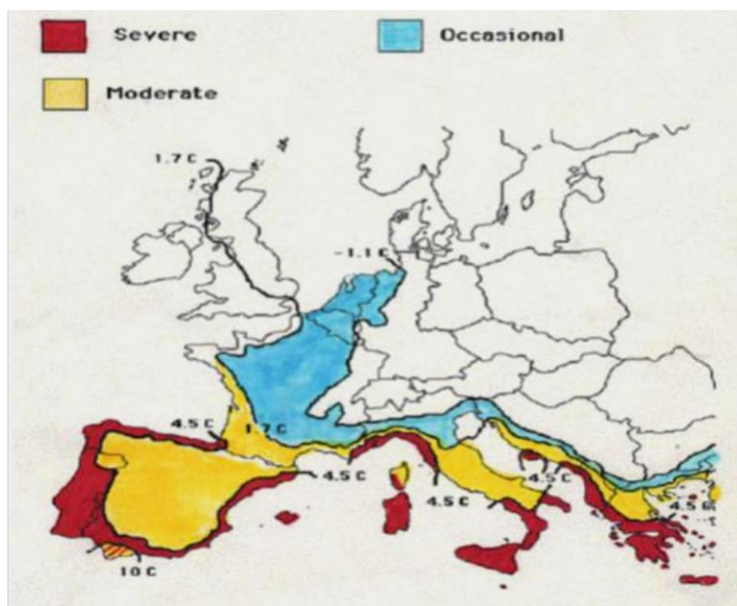


Figura 1: Probabilitat de proliferació de la bacteria  
Purcell, 1997. Journal of Plant Pathology 79: 99-105



### **1.1.1. Olivera**

#### **a) Dimensió econòmica**

El valor de la producció del sector de l'oli d'oliva es situa al voltant de 1886 milions d'€/any com a mitjana de 2007 a 2012. Aquesta xifra representa el 4,6% de la Producció de la Branca Agrària i el 7,6% de la Producció Vegetal.

El cultiu té un marcat caràcter social i s'estima que genera uns 46 milions de jornals cada campanya.

#### **b) Superfície i producció**

Espanya està situada en el primer lloc mundial en superfície i producció d'oli d'oliva. La producció espanyola representa aproximadament el 60% de la producció de la UE i el 45% de la mundial.

La superfície dedicada a aquest cultiu és de 2.584.564 ha, el que representa el 14% de la SAU (superfície agrícola utilitzada). D'aquestes hectàrees el 28% es conrea en regadiu.

La mitjana de producció a les 6 últimes campanyes (2007/08 - 2012/13) ha estat de 1.215.798 t, amb un rècord de 1.615.000 t en la campanya 2011/12. És important destacar que en l'últim decenni, la producció mitjana s'ha incrementat un 23% respecte a l'anterior període en que va ésser de 986.654 t.

#### **c) Comerç exterior**

Espanya és el primer exportador mundial d'oli d'oliva, que ocupa el quart lloc entre els productes agroalimentaris exportats des d'Espanya, només per darrere dels cítrics, el vi i la carn de porcí.

Les exportacions representen el 60% del comerç total de l'oli d'oliva a Espanya, amb més de 100 països de destinació, i amb una mitjana en les campanyes 2007/08 - 2012/13 de 745.700 t. El volum de les exportacions van pujar un 48% des de la campanya 2006/07 fins a la 2011/12.

En els últims anys destaca la tendència a l'increment de les exportacions d'oli d'oliva envasat en detriment de l'oli d'oliva a granel i el menor pes de les exportacions a la UE en el còmput total, encara que segueix sent el majoritari (prop del 75% del total va a la UE).

Les importacions tenen molta menys rellevància que les exportacions, amb una mitjana en els últims sis anys de 55.066 t. La major part de l'oli importat procedeix de la UE (el 57%), sent Portugal i Itàlia (50 i 27% sobre el total UE respectivament) els principals subministradors.

La balança comercial és clarament positiva amb un sou de 1.743 milions d'€ en l'any 2012 (Magrama 2016).

### **1.1.2. Vinya**

#### **a) Dimensió econòmica**

El valor de la producció del sector del vi i most es de 2.142,8 milions d'€/any (estimació en valors corrents a preus bàsics), aportant el 8,02% de la Producció Vegetal i gairebé el 4,8% de la Producció de la Branca Agrària.

La mà d'obra que genera el cultiu de la vinya s'aproxima als 18 milions de jornals.

#### **b) Superfícies i producció**

A Espanya la superfície plantada de vinya segons dades de Registre Vitícola de cada comunitat autònoma ascendeix a 957.573 ha. L'evolució d'aquesta superfície ha estat descendent en els últims anys, si bé en l'última campanya s'ha invertit la tendència amb un increment de la superfície plantada.

Del total de la superfície nacional, el 85% correspon a zones potencialment aptes per a l'elaboració de vins DOP i el 8% IGP.

Les varietats negres representen el 54% del total de la superfície de vinya de raïm de vinificació plantat a casa nostra.

En total el Potencial Vitícola d'Espanya es de a 1.045.427 has. potencial que inclou la superfície actualment plantada de vinya, els drets de plantació de vinya que es troben en poder dels agricultors sense utilitzar i els drets de les reserves regionals.

La producció de vi i most a Espanya es caracteritza per la seva gran variabilitat d'unes campanyes a altres, a causa de la forta dependència del cultiu de les condicions climatològiques.

### **c) Comerç exterior**

El vi és un producte amb una balança comercial positiva. Durant 2013, segons dades provisionals de Duanes, la balança comercial per al vi i most va tenir un saldo positiu de 2.600 milions d'euros.

En les últimes campanyes, l'evolució de les exportacions de vi ha seguit una tendència creixent tant en valor com en volum, passant dels 14,6 milions d'hl exportats durant la campanya 2008/2009 als 17,3 milions d'hl exportats en la campanya 2012/2013, assolint-se un record d'exportacions en la campanya 2011/2012 amb 23,1 milions d'hl.

Durant la campanya 2012/2013 s'ha exportat vi per valor de 2.442,7 milions d'€, enfront dels 1.761,3 milions d'€ que es van assolir en la campanya 2008/2009, el que suposa un increment del 39%.

Respecte a la destinació de les exportacions, la UE representa el 71% en volum i el 63% en valor, destacant França (20% del total de les exportacions com a mitjana de les cinc últimes campanyes), Alemanya (15%), Portugal (9 %), Regne Unit (8%) i Itàlia (7%).

Les principals destinacions fora de la UE de les exportacions de vi espanyoles són Rússia (5% del total), Estats units (4%) i la Xina (3%) (Magrama 2016).

## 1.2. Bacteri

*Xylella fastidiosa* (*Xanthomonadaceae*) és un bacteri associat al xilema de les plantes, difosa per insectes vectors (Retchless *et al.*, 2014). La malaltia causada per aquest bacteri va ésser descrita per primera vegada a Califòrnia al 1887 pel patòleg de plantes Newton B. Pierce. Al voltant de 14 000 ha de vinya a Califòrnia van ser destruïdes als anys 1880, però el bacteri causant de la malaltia no va ser aïllat fins al 1978 (Davis *et al.*, 1978). Al 1987 *Xylella fastidiosa* va ser descrita oficialment com a bacteri gramnegatiu que afecta al xilema de la planta hoste (Wells *et al.*, 1987). Segons la espècie vegetal infectada provoca diferents malalties, com per exemple la malaltia de Pierce a la vinya, una de les més importants a Nord Amèrica, causada en aquest cas per la subespècie *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Su *et al.*, 2013), la clorosi variegada dels cítrics (Citrus variegated chlorosis-CVC) que va ser descrita en primer lloc als tarongers de Brasil, estat de Sao Paulo, posteriorment es va estendre per tot el país llatino-americà de manera exponencial i amb el anys va afectar a quasi tots els tarongers de Brasil (*Citrus sinensis*). Actualment el bacteri a Amèrica es troba des d'Argentina fins a Ontàrio (Canada).

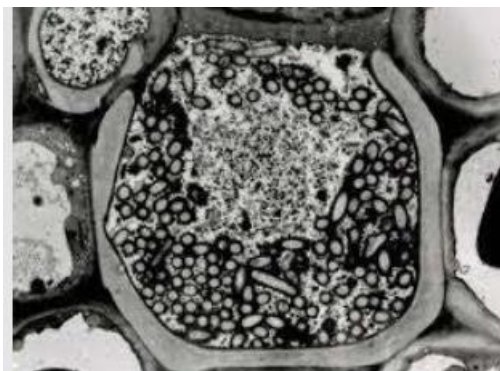


Figura 2: *Xylella fastidiosa*

Font: IRTA, Dpt Protecció Vegetal sostenible. Cabriels, Barcelona

Han estat descrites diferents subespècies de *Xylella fastidiosa* (Schaad *et al.* 2004), que afecten a diferents conreus. Si considerem tot el conjunt de subespècies, el bacteri pot arribar a infectar més de 300 espècies de plantes pertanyents a més de 60 famílies botàniques (EFSA). Segons la subespècie i les línies gèniques, tenen diferents espectres, i per tant, representen diferents graus d'amenaça a les espècies tal com es resumeix a continuació:

- *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, present a espècies com el cafè, vinya i 41 famílies més com mostra l'informe EFSA (2015).
- *X. fastidiosa* subsp. *múltiplex*, present entre d'altres a *Prunus* sp., *Quercus* sp., olivera, auró, om, etc. Segons alguns estudis podrien abordar preferentment a determinats hostes. (Nunney et al. 2013)
- *X. fastidiosa* subsp. *pauca* present als cítrics, cafè i oliveres.
- *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* present al cafè de color rosa i llorer.
- *X. fastidiosa* subsp. *morus* present a la morera (*Morus* sp.)
- *X. fastidiosa* subsp. *tashke* present a *Chitalpa tashkentensis*.

Únicament *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* i *X. fastidiosa* subsp. *múltiplex* es descriuen oficialment a la llista de nous membres de bacteris patògens de plantes (Bull et al., 2014). Algunes plantes poden arribar a ser asimptomàtiques (Retchless et al., 2014), podent actuar de font d'inòcul, això causa una gran problemàtica, principalment amb les varietats ornamentals que són les que poden fer que el bacteri es propagui a grans distàncies, degut al comerç d'importació i exportació mundial que tenim. En algunes espècies vegetals és difícil detectar el bacteri degut a la dificultat del seu cultiu, a la poca disponibilitat d'antisèrums eficients i a la presència d'inhibidors de PCR del propi bacteri i del material vegetal, quan es vol detectar per aquest mètode (Hopkins, 1985).

### 1.2.1. Situació a Europa

La primera detecció del bacteri a Europa va ser el 1998 a Kosovo (Ex-Iugoslàvia) (Berisha et al. 1998), encara que aquesta detecció no va ser verificada, posteriorment *X. fastidiosa* va ser detectada a finals de 2013 a la regió de Puglia, al sud d'Itàlia, en olivera (Saponari et al. 2013) i posteriorment seqüenciada (Loconsole et al., 2014). L'àrea contaminada, va ser estimada en 8.000 ha, actualment es de 200.000 ha. La soca aïllada a Itàlia, s'ha caracteritzat molecularment determinant-se una gran similitud amb la subespècie pauca (soca CoDIRO (Giampetruzzi et al., 2015)). Com s'observa a la figura 1, taxonòmicament està propera a una soca de Costa Rica present a les baladres i al cafè. A Itàlia, el bacteri també està present a l'ametller, cirerer i varies espècies ornamentals.

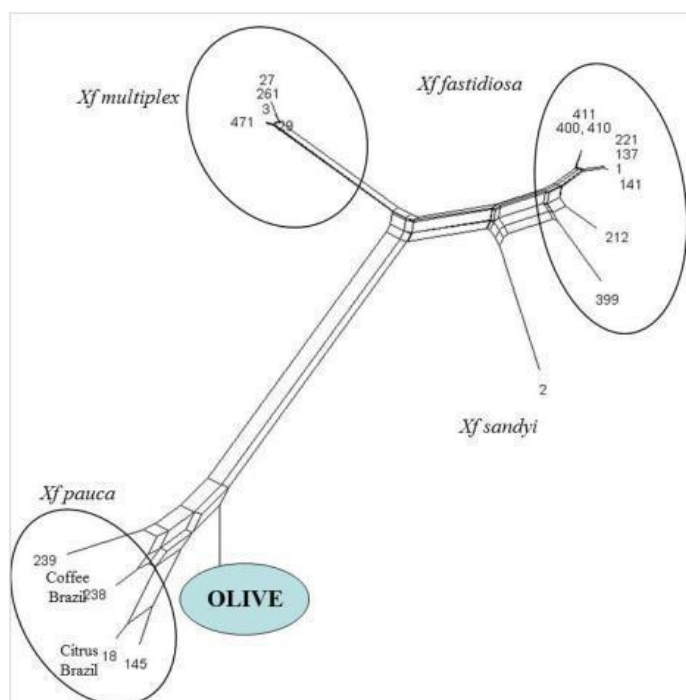


Figura 3: Variabilitat genètica subespècies

Font: EFSA Journal 2015;13(1):3989. *Xylella fastidiosa* pest risk assessment

A França, el bacteri va ser aïllat prèviament al 2012 en plantes de cafè (*Coffea arabica* i *C. canephora*) provinents d'Equador i Mèxic, per la l'Anses-LSV que s'encarrega del control sanitari de les importacions de material vegetal. A finals de 2014 i principis de 2015 van ser interceptats lots de cafè ornamental de Costa Rica i Hondures, que entraven a través dels Països Baixos, principal exportador de plantes ornamentals a tota Europa, i els serveis fitosanitaris francesos van confirmar la presència de *Xylella fastidiosa* en algunes plantes. Al juliol del 2015 per primera vegada es va detectar *X. fastidiosa* a territori francès, va ser a Propiano (Còrsega), en algunes plantes ornamentals (*Polygala myrtifolia*) d'una zona comercial. A l'octubre de 2015 es va determinar als municipis de Niza i Mandelieu la Napoule, aquesta vegada també afectava a la espècie *Spartium junceum* (Figura 4). A principis del 2016 la llista d'espècies vegetals en les que s'ha detectat a Còrsega ha augmentat considerablement.

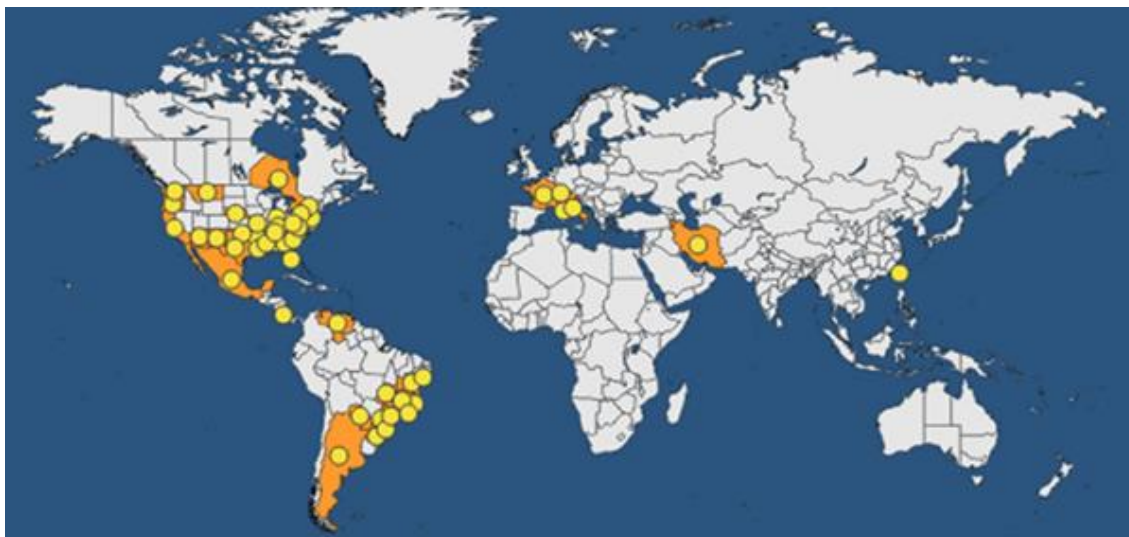


Figura 4: Situació mundial de *Xylella fastidiosa*

Font: EFSA Journal 2015;13(1):3989. *Xylella fastidiosa* pest risk assessment

La subespècie del bacteri present a les plantes franceses és *X. fastidiosa* subsp multiplex, que no és la mateixa que afecta les oliveres d'Itàlia *X. fastidiosa* subsp pauca.

D'altra banda, es va informar la detecció de bacteries a Iran al 2014, a vinyes i ametllers (Amanifar et al., 2014).

### 1.2.2. Transmissió de *X.fastidiosa*

Aquest bacteri es transmet per insectes xucladors del xilema d'on s'alimenten, a aquests insectes se'ls denomina vectors (Severin 1950).

Únicament alguns grups dels hemípters, tots ells pertanyent al subordre Auchenorrhyncha, són coneguts com a vectors eficients de la malaltia.

Les principals espècies transmissores pertanyen a les famílies *Aphrophoridae*, *Cicadellinae*, *Cercopidae* i *Cicadidae* (Young, 1968; Redak et al, 2004; Almeida, 2007; Miranda et al., 2009; Zhang et al., 2011). Tots aquests insectes tenen en comú la capacitat de incrustar profundament el seu aparell bucal dins la planta i xuclar directament el contingut dels vasos conductors del xilema (Almeida y Backus, 2004). Per això, tenen una part frontal del cap (clipec) que conté una forta musculatura connectada a un diafragma que els permet l'aspiració dels líquids del xilema sota una alta pressió negativa.

La transmissió del bacteri a través del vector segueix tres passos ben diferenciats:

- 1.-Adquisició del bacteri: El vector extreu la saba d'una planta infectada amb *X. fastidiosa*
- 2.-El bacteri s'adhereix a la cutícula de la cavitat oral de l'insecte i es multiplica.
- 3.-El bacteri es separa i s'inocula a una nova planta en el moment d'alimentar-se l'insecte de la mateixa (Redak et al., 2004).

Durant l'etapa de larva dels insectes no hi ha transmissió de la malaltia, degut a què les larves no posseeixen ales per desplaçar-se a plantes adjacents. La transmissió dels adults es produeix mitjançant les seves eines bucals i no per cap altre canal, la propagació la fan saltant d'una fulla a una altra, per tant, els insectes que passen l'hivern en forma d'ou o larva jove no seran infecciosos fins a la següent primavera (Freitag, 1951). L'adult que s'alimenta d'una planta infectada immediatament és ja capaç de transmetre la malaltia (el període més curt de latència observada es de 2h) (Severin, 1949, Rodas, 1994), aquest bacteri es multiplica a la cavitat oral dels insectes i roman infecciós durant uns quants mesos (Purcell y Finlay, 1979; Hill y Purcell, 1995). La capacitat de dispersió d'aquests insectes es relativament baixa, de l'ordre d'uns centenars de metres al llarg de la seva vida.



### 1.3. Vectors

El coneixement dels vectors eficaços d'aquest bacteri es limita principalment a vectors americans. De fet, gairebé tots els vectors de malalties conegudes a Amèrica no es troben a Europa i, en conseqüència, el coneixement de vectors europeus es molt reduït. Fins a la data, s'ha demostrat que només un Aphrophoridae (*Philaenus spumarius* L. (Figura 5) és capaç de transmetre el bacteri a la vinca de Madagascar a Itàlia (Saponari et al, 2014b) i dues altres espècies: *Neophilaenus campestris* (Aphrophoridae) i *Euscelis lineolatus* Brullé (Cicadellidae) poden ésser portadors del bacteri, no havent-se demostrat si són capaçs de transmetre'l. *Philaenus spumarius* ja era conegut com a vector a Amèrica del Nord des de finals dels anys 50, encara que de forma no massa eficient. Al continent americà el vector més eficient és *Homalodisca vitripennis*. Aquesta espècie és la principal responsable de la transmissió del bacteri en cítrics a Sud Amèrica i posteriorment va ésser la principal responsable de l'explosió de la malaltia en vinya a Nord Amèrica (Califòrnia i Florida), al ser introduïda amb cítrics procedents del Brasil.

A Europa segons EFSA els potencials vectors pertanyerien a les famílies: Cicadellidae subfam. Cicadellinae (*Cicadella viridis*), Cicadidae (*Cicada* sp.), Aphrophoridae (*Philaenus spumarius*, *Neophilaenus* sp. i *Aphrophora* sp.) i Cercopidae (*Cercopis* sp.).

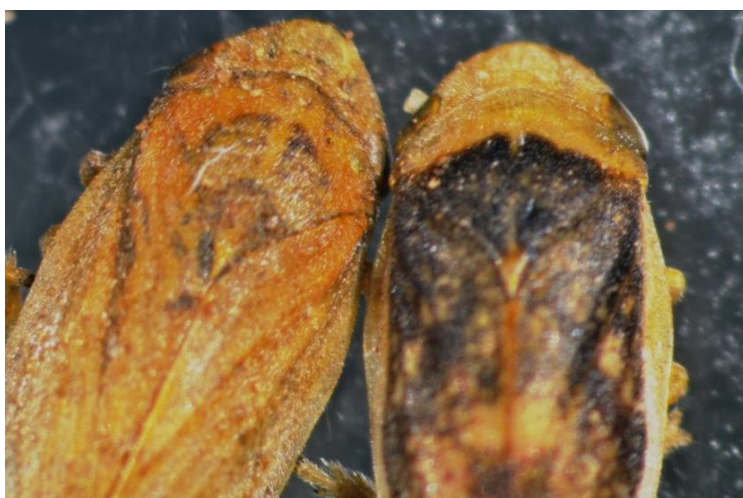


Figura 5: *P. spumarius*: forma typica /forma marginella

Font: Jordi Sabaté

## 2. Objectius

Aquest treball té com a objectius:

1.-Identificar els vectors potencials del bacteri en àrees fructícoles i vinícoles de la península.

2.-Analitzar els vectors mitjançant PCR per descartar que siguin portadors del bacteri.

3.- Realitzar una prospecció en cultius d'olivera, vinya, jardins, centres de jardineria i vivers de plantes ornamentals, tant d'espècies que poden mostrar símptomes com d'altres que puguin ser hostes del bacteri i a vegades asimptomàtiques com *Polygala myrtifolia*, *Spartium junceum* i *Nerium oleander*, entre d'altres.

4.-Estudiar la dinàmica poblacional de *Philaenus spumarius* en diferents àrees geogràfiques de Catalunya. Identificar plantes silvestres que puguin ser hostes del vector com gramínies, compostes i altres.

### 3. Material i mètodes

Els materials i mètodes queden separats segons a l'objectiu que pertanyen, l'apartat de captura d'insectes es realitza amb la finalitat d'obtenir resultats per el primer i el quart objectiu, que són els que estan relacionats amb la identificació d'insectes vectors del bacteri.

D'altre banda tots els materials i mètodes relacionats amb l'àmbit de la biotecnologia com extraccions d'ADN, PCR, etc, són per a l'obtenció de resultats del segon i tercer objectiu.

#### 3.1. Captura d'insectes

La captura d'insectes per la identificació dels diferents vectors potencials de *Xylella fastidiosa* es va dur a terme entre els mesos d'abril i Juny de 2016, a diferents punts de Catalunya (Cabrils, Gadesa, Caldes de Montbui, Sant Boi). També s'han comptabilitzat, classificat i analitzat els insectes capturats amb dos anys d'antiguitat 2014/15 a altres comunitats autònomes, de àrees vinícoles com La Rioja, Navarra, País Basc i Castella, que es guardaven al congelador.

El primer i més important punt de mostreig va ser la riera de Cabrils, gràcies a l'abundància de població de *Philaenus spumarius* i a la seva proximitat del centre de treball, uns 200m, i es va realitzar setmanalment des del mes de maig, amb la finalitat de determinar la dinàmica poblacional del vector (Objectiu 4). D'altre banda es van triar parcel·les pertanyents a l'IRTA ubicades a les zones de Tarragona, Gadesa, Vallbona i Caldes de Montbui, on el mostrejos es varen realitzar quinzenalment. Finalment, es van fer aspiracions, de forma puntual a Sant Boi, Sant Celoni, Amposta i Vilassar de dalt.

A causa de l'alta heterogeneïtat de les condicions agroecològiques i comunitats de males herbes, a les àrees mostrejades, la captura d'insectes es va realitzar sobre la coberta vegetal del interior i marges de les parcel·les.

Els insectes van ser capturats puntualment o quinzenalment, excepte a la riera de Cabrils, amb un aspirador D-Vac amb un diàmetre de 25 cm de superfície d'aspiració, en quatre repeticions per parcel·la. Les aspiracions es van dur a terme de forma lineal, caminant 2 minuts i abastant 20 metres lineals aproximadament (0,25 m x 20 m = 5 metres quadrats) (Figura 6).



Figura 6: Aspiració

Font: Jordi Sabaté

Una vegada en el laboratori els insectes es van classificar seguint el següents criteris (Holzinger et al 2003).

El principal objectiu era identificar insectes pertanyents a l'ordre *Hemiptera*, és a dir, insectes amb aparell xuclador. Dintre d'aquest ordre es troben el subordre *Fulgoromorpha*, principalment insectes xucladors de floema, i *Cicadomorpha*. El subordre *Cicadomorpha* són els que tenen forma de cicadela (forma el·líptica, sense separació clara entre cap i cos), característica important que ens ajuda a distingir una família d'altra. Aquests últims són els que ens interessin com a possibles vectors del bacteri, ja que alguns *Cicadomorpha* són xucladors de xilema, i els podem identificar per l'absència de quilla.

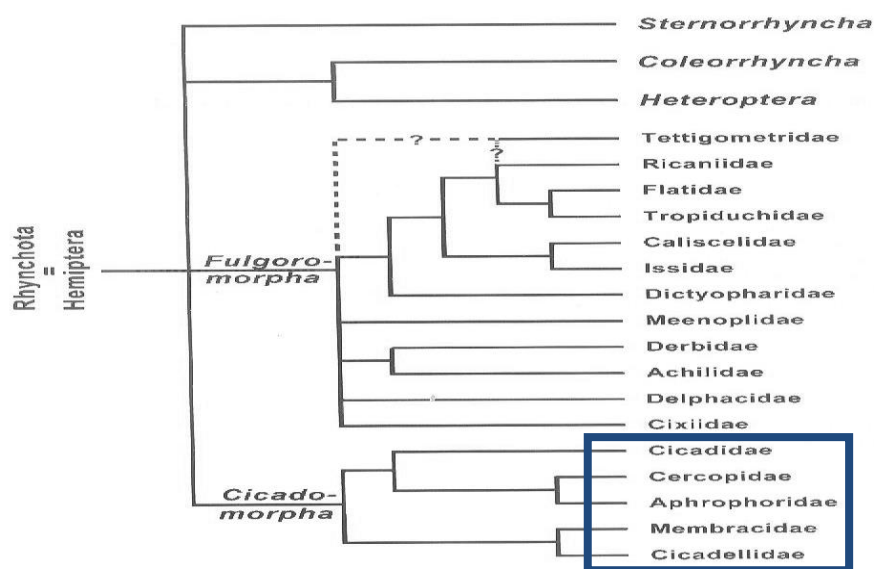


Figura 7: Classificació del ordre *Hemiptera*

Font: (Holzinger et al 2003)

Les 5 famílies pertanyents al subordre *Cicadomorpha* són: *Cicadidae*, *Cercopidae*, *Aphrophoridae*, *Membracidae* i *Cicadellidae* (Figura 6). Si amb els criteris esmentats anteriorment no som capaços de classificar l'insecte, el següent criteri seria la morfologia de les potes, per diferenciar les diferents famílies de cicadomorfs.

Les potes de *Aphrophoridae* estan compostes per una tibia a la part superior, tars I, II i III de dalt a baix i amb un "platellae" a la part central (apartat D, Figura 7). D'altra banda espècies de la família *cicadellidae* (tibia amb espines) també s'alimenten de xilema, però a Europa només es troben presents dues espècies *Cicadela viridis* i *Graphocephala sp* (apartat C, Figura 7).

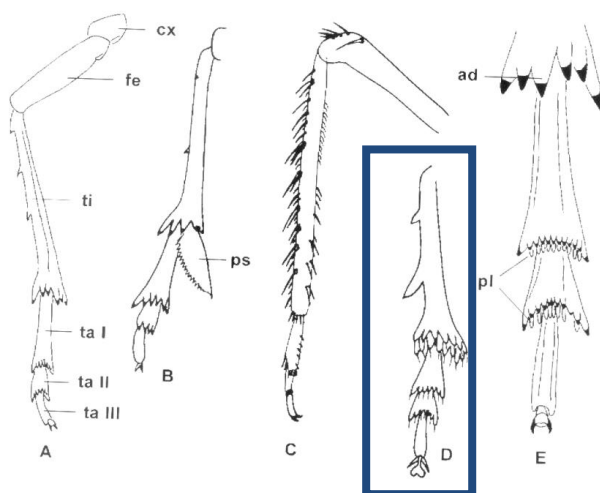


Figura 8: Morfologia de les potes pertanyents al ordre de *Hemiptera*

Font: (Holzinger et al 2003)

Per tant, els únics insectes que seguirien els criteris esmentats anteriorment i que poden ser vectors de *X.fastidiosa* són: *P.spumarius*, *Neophilaenus sp.*, *N.lineatus*, *Cicadela viridis*, *Graphocephala sp*, *Cercopis sp.* i *Aphrophora sp.* Una vegada capturats i classificats aquests generes es van emmagatzemar en tubs Eppendorf (1,5mL) a -20 ° C fins el seu posterior anàlisi, seguint la metodologia de Sabaté et al. (2014).

### 3.2. Extracció d'ADN per detecció del bacteri en plantes i insectes amb tampó CTAB.

L'extracció d'ADN es va realitzar a partir d'un gram de tija (Xilema), nervis de fulla i/o borrons en el cas de les plantes (Figura 7) i en el cas dels insectes s'utilitzava directament l'individu.

Les extraccions d'ADN dels insectes i de les mostres vegetals, es va realitzar seguint la tècnica de Garcia-Chapa et al. 2005.



Figura 9: Extracció de nervis amb un bisturi

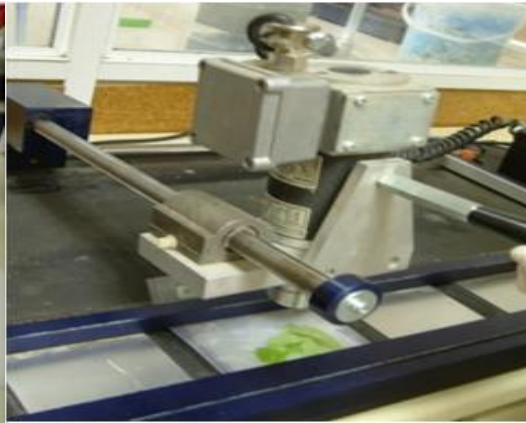


Figura 10: Homogeneïtzació de mostra per detecció del bacteri en un homogeneïtzador Homex, utilitzant bosses Bioreba.

Extracció d'ADN a partir de mostres vegetals i insectes:

- 1g de nervis de fulles + 8mL de tampó CTAB 3% (Tris 1M, EDTA 20mM, NaCl 1,4M, pH 8, CTAB 3%), s'homogeneïtzen en bosses individuals d'extracció Bioreba (figura 8), utilitzant un homogeneïtzador Homex (Figura 8). El tampó CTAB s'hi afegeix en el moment d'utilitzar 0,2% de mercaptoetanol.



- 1mL del extracte del pas anterior, es diposita en un eppendorf de 2 mL. En el cas dels insectes, aquests es trituren individualment en eppendorfs amb 500 µl de tampó CTAB al 2%. A partir d'aquí l'extracció segueix igual per vegetals i insectes



- Incubació a Bany Maria a 65°C durant 20'.
- ↓
- Afegir cloroform V/V i agitar bé.
- ↓
- Centrifugar durant 10 minuts a 11000 rpm, a Tª ambient (20°C).
- ↓
- Agafar la fase superior i posar-la en un altre eppendorf de 1,5 ml.
- ↓
- Afegir isopropanol V/V.
- ↓
- Centrifugar durant 15 min a 11000 rpm, en fred a 4°C.
- ↓
- Decantar l'isopropanol i rentar els precipitats d'ADN amb 1 ml d'etanol 70%.
- ↓
- Centrifugar 5 min a 12000 rpm i decantar l'etanol. Deixar assecar.
- ↓
- Resuspendre els precipitats en 50 µl de té (10 mM Tris, 1 mM EDTA) o en Aigua estèril.

### 3.3. Realització de la PCR per a la detecció del bacteri

L'anàlisi de detecció del bacteri es va realitzar mitjançant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa o PCR. Mitjançant aquesta tècnica es poden amplificar fragments d'ADN que estiguin compresos entre dos petites seqüències, de entre 15 i 25 nucleòtids que anomenem primers o encebadors. Per a la amplificació d'aquesta seqüència s'utilitza l'enzim ADN Polimerasa, encarregat de la síntesi del ADN. Perquè hi hagi doncs amplificació es necessiten els primers, DNA Polimerasa, els 4 nucleòtids que componen l'ADN (adenina, timina, citosina i guanina) i un tampó adequat, així com un extracte d'ADN de la mostra a analitzar i en la que volem determinar si hi ha l'ADN corresponen al patògen vegetal que volem identificar. Es van realitzar dos tipus de PCR, la PCR de punt final i la PCR a temps real.

La seqüència de bases dels primers HL5/HL6 utilitzats en la PCR punt final i PCR a temps real són les següents. Per la PCR a temps real es va utilitzar la sonda que també es cita a continuació (Francis et al. 2006). Per algunes mostres es van realitzar dos tipus de PCR a temps real, la citada de Francis et al. 2006 i el kit de Qualiplant.

<b>HL5</b>	<b>5'-AAGGCAATAAACGCGCACTA-3'</b>
<b>HL6</b>	<b>5'-GGTTTGCTGACTGGCAACA-3'</b>
<b>Probe</b>	<b>5'-TGGCAGGCAGCAACGATACGGCT-3' (PCR real time)</b>

Taula 1: Primers HL5/HL6 i sonda (Francis et al. 2006)

#### 3.3.1. PCR de punt final o clàssica

La solució per la PCR de punt final es va realitzar amb els iniciadors HL5-HL6 (Francis et al. 2006). La solució de PCR contenia els següents reactius a la concentració que es senyala a continuació. Una vegada preparada la solució es repartia en plaques de PCR amb 96 pouets per a 96 mostres, a raó de 10 µl per pouet.



El volum de solució de PCR per mostra va ésser de 10 µl

- Taq 2X Master Mix\*      6 µl de la solució.
- HL5, 10 µM.              0,5 µl de la solució.
- HL6, 10 µM.              0,5 µl de la solució.
- H2O.                        La resta fins a 10 µl.

Aquest volum es multiplica pel nombre de mostres a realitzar i una vegada repartit a la placa s'afegeix l'extracte de ADN de la mostra a cada pouet a raó de 2 µl d'ADN per pouet.

\*Taq 2X Master Mix, és una solució llesta per utilitzar que conté dNTPs, Taq DNA polimerasa, MgCl<sub>2</sub> i tampó estabilitzador de PCR. Si s'utilitzen 12 µL de volum final (solució de PCR + ADN), es posaran 6 µL de Master Mix.

#### **a)                    PCR al termociclador.**

Una vegada omplertes les plaques, es col·loquen al termociclador on té lloc l'amplificació de l'ADN. Perquè hi hagi suficient síntesi i amplificació es necessiten un nombre determinat de cicles amb tres temperatures diferents a cada cicle. Com més cicles, més ADN amplificat tindrem, ja que la progressió es exponencial.

Les tres temperatures de cada cicle són: primer 92°C, a aquesta temperatura les dos cadenes d'ADN es separen (desnaturalització). A continuació, una temperatura d'entre 50 i 60°C, a aquesta temperatura els encebadors s'enganxen a les seves seqüències complementaries si hi són (hibridació). Finalment 72°C, a aquesta temperatura té lloc la síntesi de la copia d'ADN entre els dos iniciadors (elongació).

**b) Condicions de PCR al termociclador.**

Per poder triar les condicions al termociclador, es va utilitzar com a guia l'article de Francis et al 2006, però al treballar sense HotStart Taq polimerasa que necessita 15 minuts previs a 95°C d'activació, es van fer les modificacions oportunes per a la Taq utilitzada:

- 94°C 4' (desnaturalització prèvia i activació enzimàtica)

45 cicles de:

- 95°C durant 30". (Desnaturalització)

- 56°C durant 30". (Hibridació)

- 72°C durant 45". (Elongació)

- Cua de 7 min a 72°C i manteniment en fred.

**c) Electroforesi.**

Una vegada finalitzada la PCR es realitza una electroforesi per tal de visualitzar si s'ha amplificat l'ADN que es pretenia detectar, i per tant saber quines mostres eren positives, és a dir, infectades pel bacteri.

Per realitzar l'electroforesi es col·loquen les mostres en un gel d'agarosa al 1,5% en un tampó TBE 0,5x. i es fan córrer en una cubeta d'electroforesi a 100 V per tal de que es separin les bandes d'ADN. A més a més de les mostres es col·loca un marcador de pes molecular, que és un ADN digerit amb un o dos enzims, de manera que al realitzar la PCR s'observen bandes de diferents pesos moleculars. En el gel es col·loca un fluorocrom per tal de tenyir l'ADN i que es pugui visualitzar mitjançant llum ultraviolada si està present la banda d'ADN corresponent al patogen que volem determinar.

### 3.3.2. PCR Real-Time o PCR a temps real

També s'ha realitzat la PCR a temps real amb els encebadors i sondes TaqMan.

La PCR a temps real permet detectar quantitats molt petites d'amplificat mitjançant la lectura directe de la fluorescència produïda a cada cicle de la PCR (Christensen et al. 2004). A més aquesta tècnica permet quantificar els productes amplificats.

Per la realització de la PCR a temps real es poden utilitzar fonamentalment dos procediments: la utilització de sondes TaqMan<sup>TM</sup> i la tinció de la doble cadena d'ADN amb SYBR<sup>®</sup> green I. Les sondes TaqMan<sup>TM</sup> s'estan aplicant per a la detecció i quantificació de virus (Mumford et al., 2000; Olmos et al., 2004), bacteris (Oliveira et al., 2002), fitoplasmes (Marzachi et al. 2005, Bech et al., 2010) i fongs (Lees et al., 2002). La tinció genèrica amb SYBR<sup>®</sup> green I, es un mètode menys generalitzat però que en els darrers anys s'ha aplicat amb èxit a la detecció i quantificació de *Fusarium solani* (Filion et al., 2003), *Pyrenophora* spp. (Bates et al., 2001) i a la del fitoplasma de la proliferació de la pomera (Jarausch et al. 2004; Torres et al., 2005) i dels *Chrysanthemum yellows* (Marzachi et al. 2005).

Les etapes són les mateixes que les assenyalades anteriorment per la PCR de punt final; desnaturalització, hibridació i elongació.

#### Fonaments de la Real time amb sonda TaqMan<sup>TM</sup>

Les sondes TaqMan permeten mesurar la producció de productes de PCR mitjançant un sistema de sondes marcades per 2 fluorocroms. La seva utilitat radica en què posseeixen un fluorofor en el seu extrem 3' i una molècula al 5' que bloqueja l'emissió de fluorescència, anomenada "quencher". D'aquesta manera, quan s'efectuà la PCR, la sonda s'hibrida amb la seqüència homòloga si hi és, però, degut a la proximitat del fluorocrom al quencher, no s'emet fluorescència; quan la polimerasa actua per realitzar la síntesi d'ADN topa amb la sonda i la hidrolitza mitjançant la seva activitat exonucleasa 5'-3', la qual provoca la separació del quencher del fluorocrom i, per tant, l'emissió de fluorescència relacionada amb la quantitat d'amplificació produïda (Figura 6).

Una diferència primordial respecte a la tinció amb SYBR® green, es que la fluorescència que es produeix és específica de la seqüència que reconeix la sonda, a més també té la possibilitat d'utilitzar varis fluorocroms en la mateixa reacció i poder detectar varis ADN/ARN al mateix temps (diferents aïllats d'un mateix patògen o diferents patògens). Una de les desavantatges que podem trobar amb aquest mètode és que hem d'utilitzar sondes específiques per a cada estudi.

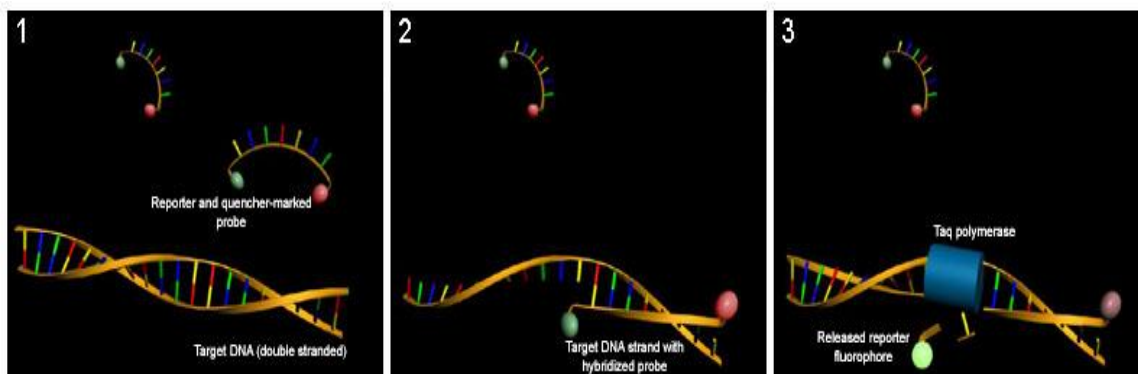


Figura 11: Seqüència d'actuació sonda tipus TaqMan. D'esquerra a dreta desnaturalització, hibridació i elongació, a la seqüència 3 la polimerasa topa amb la sonda hidrolitzant el fluorocrom i alliberant-lo del quencher. Font: Qualiplant Kit

Tal com s'ha indicat quan la mostra és positiva s'emet fluorescència degut a que queda lliure el fluorocrom, a cada cicle de la PCR la fluorescència serà més gran seguint una corba exponencial. El N° Ct és el numero de cicles al qual la fluorescència assoleix un nivell superior al soroll de fons. A menys Ct més concentració de l'ADN que s'està detectant. A la Figura 10 es poden veure les Ct obtingudes per diferents dilucions (figura 10).

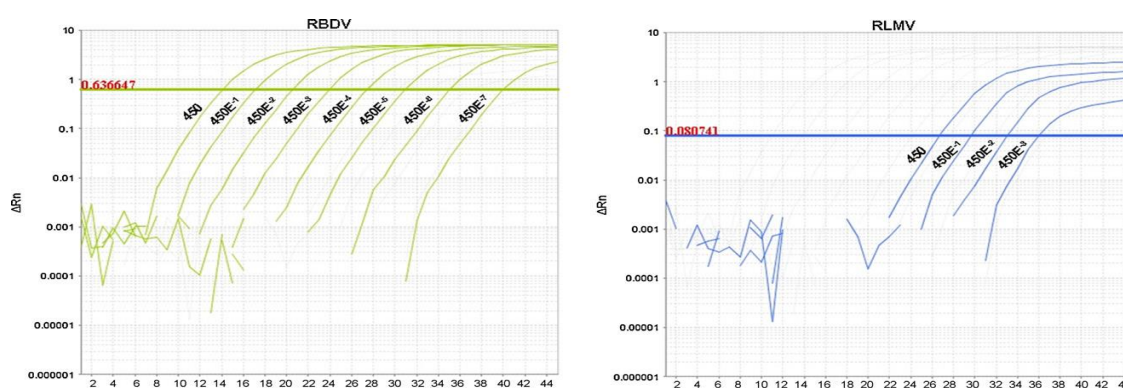


Figura 12:- Amplificació mitjançant PCR a temps real (corbes d'amplificació de diferents dilucions)

### **a) Reactius per la Real-Time PCR.**

Per tal de realitzar la PCR a temps real es van emprar les següents proporcions per elaborar-la i es van col·locar en unes plaques expressos per el correcte funcionament del termociclador.

Tal com s'ha indicat anteriorment es van realitzar dos metodologies de PCR a temps real. En primer lloc es van analitzar totes les mostres amb el kit de Qualiplant i per algunes mostres es va duplicar l'anàlisi utilitzant els primers i sonda de Francis et al. 2006, per tal de validar també aquesta tècnica.

Concentració dels reactius de Qualiplant

- Kit Qualiplant                    8 µl de la solució.

- DNA a analitzar                2 µl (5-10 µg).

-El kit, de Qualiplant és un kit comercial que conté dos primers específics per detectar totes les soques de *X. fastidiosa* i també una sonda específica, dNTPs, Taq DNA polimerasa, i també estabilitzador de PCR.

Quan es van utilitzar els primers i sonda de Francis et al.(2006), es van emprar les següents concentracions i reactius:

- Master mix 2 X de Applied Biosystems

- HL5, 10 µM.    0,4 µl de la solució.

- HL6, 10 µM.    0,4 µl de la solució.

- Sonda                    0,2 µl de la solució.

**b)                    Condicions de Real-Time PCR al termociclador**

Es van seleccionar aquestes condicions al termociclador, que venien donades per els proveïdors del Kit de detecció de XF de qualiplant. Les mateixes condicions es van emprar quan s'utilitzaven els primers i sonda de Francis et al.(2006):

- 3' a 95°C. (Activació enzimàtica)

40 cicles de:

- 15'' 95°C. (Desnaturalització)

- 45'' 62°C. (hibridació i elongació)

## 4. Resultats

### 4.1. Objectiu 1: Identificació de vectors potencials del bacteri en àrees fructícoles i vinícoles del nord i nord-est de la península

Entre els milers d'insectes agafats i triats es van capturar espècies pertanyents a 5 gèneres dels citats per l'EFSa, com a possibles vectors de *X. fastidiosa* a Europa. Entre elles *Philaenus spumarius*, espècie responsable de l'epidèmia a Itàlia i també vector als EEUU.

Els gèneres i o espècies identificades com a vectors potencials en les zones estudiades són les següents:

#### ***Aphrophora* sp.:**

*Aphrophora* sp., és un gènere d'insectes que pertany a la família *Aphrophoridae*. Aquests insectes fan entre 9 i 10 mm de llarg, són molt comuns a Europa, viuen en els arbres (vern, àlber, salze), els adults es poden trobar de juny a setembre, morfològicament el que els diferencia és que el seu pronot té una cresta central. Els adults fabriquen una escuma per envoltar els seus ous amb la finalitat de aconseguir una humitat i una temperatura òptima per ells, quan eclosionen els ous les larves s'alimenten de saba i continuen fabricant l'escuma per amagar-se i protegir-se dels seus depredadors.



Figura 13: *Aphrophora* sp.  
Font: Jordi Sabaté

***Cercopis Intermedia:***

És un insecte comú a Europa, és un hemípter fàcil d'identificar per als seus colors vius, vermell i negre, presents a tota la espècie de *Cercopis sp.* No obstant això, la seva principal característica que el diferencia dels de la resta d'espècies del seu gènere, és que té una zona de les potes de color vermella.

Fa al voltant d'1 centímetre. Viu en herbes o plantes llenyoses, principalment en zones boscoses. La larva és de color blanquinós, els adults fabriquen una escuma per envoltar els seus ous amb la finalitat de aconseguir una humitat i una temperatura òptima, quan eclosionen els ous les larves s'alimenten de saba i continuen fabricant l'escuma per amagar-se i protegir-se dels seus depredadors.

L'adult és visible des del maig fins a agost. Pot volar i està proveïda de potes del darrere saltatòries molt eficaçes, té un salt molt potent, poden arribar fins als 70 centímetres (H. Nickel 2003).



Figura 14: *Cercopis intermedia*  
Font: Jordi Sabaté

***Cicadela Viridis:***

Els adults arriben dels 6 als 9 mil·límetres de longitud, però les femelles són bastant més grans que els mascles, es poden trobar en els prats humits, prop de pantans o en hàbitats pantanosos, però de vegades també viuen a les zones més seques.

El seu pronot és de color verd i groc. El cap és de color groc pàl·lid, amb dues taques negres a prop dels ulls. Les ales anteriors són de color turquesa verd a les femelles, blau o blavós fosc en els mascles (dimorfisme sexual). Són polífagues, s'alimenten de la saba de diverses espècies de plantes herbàcies, principalment *Juncaceae sp.*, *Cyperaceae sp.*, *Poaceae sp.*, i espècies de



*Fabaceae*. Les larves són de color groguenc i tenen dues franges de color marró que s'executen des del cap fins a l'extrem de l'abdomen. *Cicadella viridis* pot tenir una o més generacions per any. Aquesta espècie passa l'hivern en estat d'ou. Els adults majoritàriament es poden trobar a partir de juliol i fins a octubre (H. Nickel 2003).



Figura 15: *Cicadella viridis*  
Font: Jordi Sabaté

***Neophilaenus lineatus*:**

Principalment es troba a zones d'herba, poden arribar a fer de 5 a 7 mm de longitud. *N. lineatus* és caracteritzat per la línia pal·lida a la vora exterior de les ales anteriors, i per la "placa" central anterior en el vèrtex que és més ampla que llarga. L'àpex de l'escutel és normalment fosc, i a la cara té línies transversals fosques. Els adults fabriquen una escuma per envoltar els seus ous amb la finalitat d'aconseguir una humitat i una temperatura òptima per a aquests, quan eclosionen els ous les larves s'alimenten de saba i continuen fabricant l'escuma per amagar-se i protegir-se dels seus depredadors. L'adult es pot trobar entre el juny i novembre, a vegades poden arribar a passar l'hivern (H. Nickel 2003).



Figura 16: *Neophilaenus lineatus*  
Font: Jordi Sabaté

***Philaenus spumarius:***

L'espècie aconsegueix una longitud corporal de 5-7 mil·límetres. La majoria de les femelles són lleugerament més grans que els mascles. La coloració del cos és molt variable (es coneixen al voltant de 20 colors diferents). En general són de color groguenc, marró o negre, amb taques brillants sobre un fons fosc, sinó també amb marques fosques en un fons més clar (Figures 5 i 11).

Les femelles posen els ous individualment o en grups sobre les plantes on s'alimenten les larves. Una sola femella pot produir de 350 a 400 ous. En èpoques climàtiques desfavorables, aquests insectes únicament poden sobreviure en forma d'ous.

Les larves són ben conegudes pels nius d'escuma auto-generats, que es poden observar a la primavera. Els nius d'escuma estan protegits en gran mesura dels depredadors i també obtenen la humitat i temperatura necessària per al desenvolupament, pel que la seva mortalitat segueix sent baixa fins i tot amb mal temps. L'etapa larval dura uns 50 dies. Els adults deixen el niu d'escuma només quan està completament seca. Aquest període té una durada de uns deu dies. Les femelles s'aparellen poc després. L'adult és visible des de finals d'abril fins al octubre (H. Nickel 2003).



Figura 17: Imatge: *Philaenus spumarius* formes: típica, fasciata i marginella

Font: Jordi Sabaté

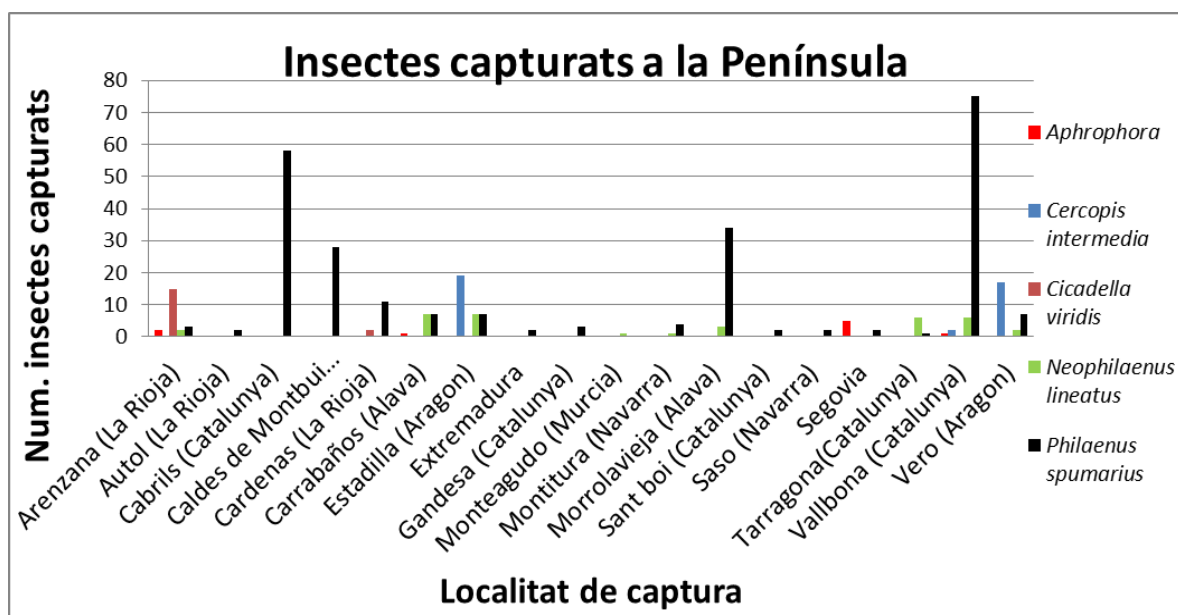


Figura 18: Resultat de la prospecció realitzada a la Península Ibèrica per identificar espècies d'insectes pertanyents a gèneres de potencials vectors de *Xylella fastidiosa*

Al Gràfic 1 s'observa el resultat del mostreig de vectors de *X. fastidiosa* realitzat a diferents àrees de la Península Ibèrica. es van capturar un total de 346 individus en diferents localitzacions de tota la península durant els anys 2014 i 2015 i fins al mes de Juny de 2016. L'espècie més freqüent va estar *Philaenus spumarius* amb un total de 248 individus, seguit de *Cercopis intermedia* amb 38, *Neophilaenus lineatus* amb 35, *Cicadella viridis* amb 17 i finalment *Aphrophora sp.* amb 8, a cap de les localitats mostrejades es van capturar les 5 espècies a la vegada. Les zones amb més nombre d'insectes capturats van ser Vallbona, Cabrils, Morrolavieja i Estadilla, on s'estaven portant a terme projectes sobre la identificació de vectors d'altres patògens com els del fitoplasma causant de la fusta negra o Bois Noir.

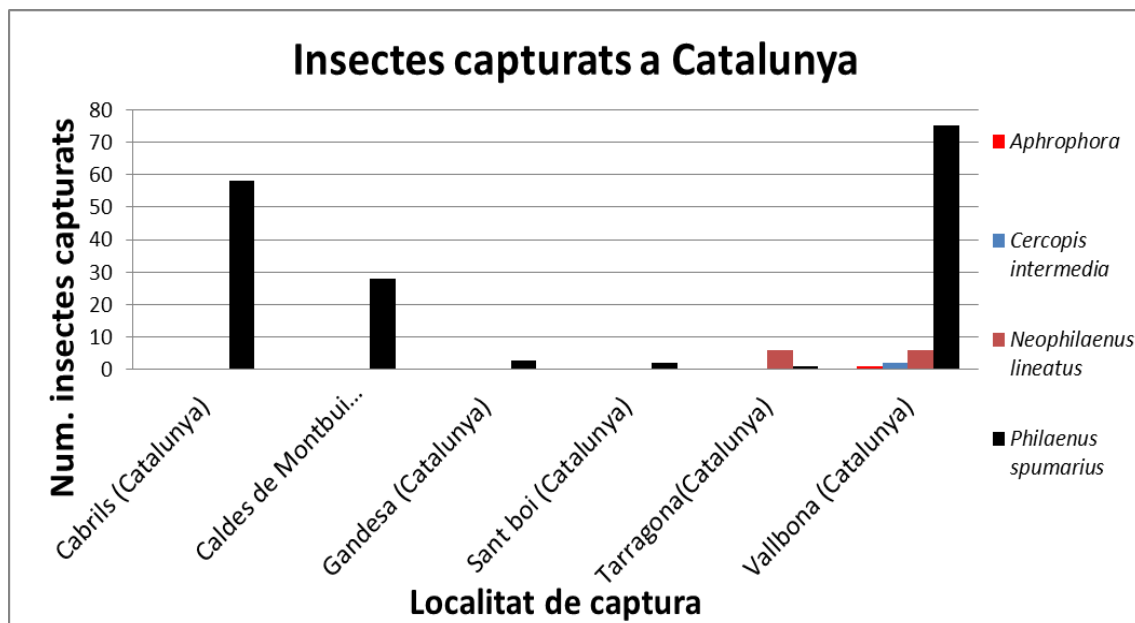


Figura 19: Resultat de la prospecció realitzada a Catalunya per identificar espècies d'insectes pertanyents a generes de potencials vectors de *Xylella fastidiosa*

Al Gràfic 2 s'observa el resultat del mostreig de vectors de *X. fastidiosa* realitzat a diferents àrees de Catalunya. es van capturar un total de 189 individus en diferents localitzacions, durant els anys 2014 i 2015 i fins al mes de Juny de 2016. L'espècie més freqüent va estar *Philaenus spumarius* amb un total de 167, seguit *Neophilaenus lineatus* amb 19, *Cercopis intermedia* amb 2 i finalment *Aphrophora sp.* amb 1, *Cicadela viridis* no va ser capturat a cap localitat de Catalunya, com ja succeïa al gràfic 1 les localitats que aporten més mostres al volum total de dades són Vallbona i Cabriels, seguit de Caldes de Montbui, on l'IRTA posseeix el centre de investigació "Torre Marimon".

## 4.2. Objectiu 2: Anàlisi dels vectors mitjançant PCR per descartar que siguin portadors del bacteri.

Durant la realització d'aquest treball s'han analitzat totes les mostres obtingudes i cap d'elles a donat positiu excepte els controls, ja sigui per PCR real time o per PCR punt final. Com s'observa a la taula 4 el nombre de PCR punt final es més elevat que el de real time, això ve donat per la diferència econòmica entre una i altre. Totes les mostres han estat analitzades per PCR punt final i una part d'aquestes per PCR a temps real. Quaranta mostres de *Philaenus* van ser analitzades únicament amb la PCR real time.

Etiquetes de fila	Total analitzats	PCR RT	PCR punt final
<b>Aphrophora</b>	8	8	8
<b>Cercopis intermedia</b>	38	19	38
<b>Cicadella viridis</b>	17	8	17
<b>Neophilaenus lineatus</b>	35	28	35
<b>Philaenus spumarius</b>	248	155	208
<b>Total general</b>	<b>346</b>	<b>218</b>	<b>306</b>

Taula 2: PCR punt final i RT realitzades

A continuació podem observar un gel de PCR punt final per l'anàlisi de 26 mostres, mitjançant els primers específics HL5/HL6 de Francis et al. 2006. Les mostres de la 1 a la 15 són *Philaenus spumarius* de Vallbona, de la 16 a la 21 *Cercopis intermedia* de Estadilla, de la 22 a la 24 *Cicadella viridis* de Arenzana, la 25 *Aphrophora sp.* de Segòvia i la mostra 26 és un control positiu de *X. fastidiosa* de Brasil, com s'observa a la imatge el bacteri amplifica a 221 parells de bases.



Figura 20: Resultat de la electroforesi en gel d'agarosa dels productes obtinguts mitjançant PCR amb els primers HL5 i HL6

### Validació de la PCR a temps real per a la detecció de *X.fastidiosa*.

Abans d'utilitzar la PCR a temps real es va comprovar la sensibilitat de la mateixa, realitzant la PCR amb una sèrie de dilucions dels controls positius del que es disposaven. Es van fer una sèrie de 6 dilucions de  $10^{-2}$  fins a  $10^{-6}$  (figura 13), posteriorment es van analitzar les mostres de la taula 3.

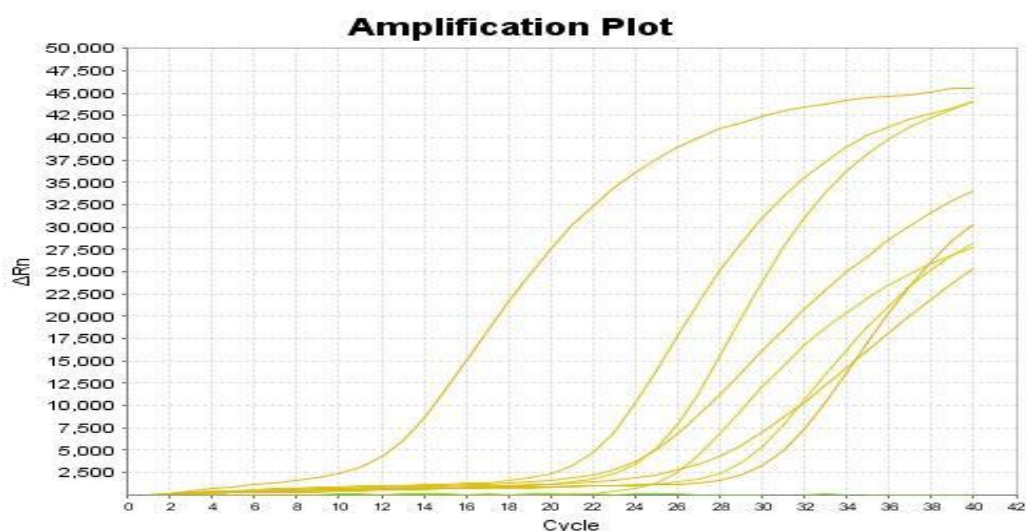


Figura 21: Detecció de *X. fastidiosa* mitjançant PCR a temps real (Harper et al. 2010; kit Qualiplante)  
Control positiu Qualiplante, dilució  $10^{-2}$ , Control positiu Brasil 14 Ct, dilucions  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ .

Posició	Espècie	Localitat	Resultat
B1	C-	Qualiplante	Undetermined
B2	C-	Qualiplante	Undetermined
B3	<i>Philaenus spumarius</i>	Morrolavieja	Undetermined
B4	<i>Philaenus spumarius</i>	Carrabaños	Undetermined
B5	<i>Philaenus spumarius</i>	Morrolavieja	Undetermined
B6	<i>Philaenus spumarius</i>	Morrolavieja	Undetermined
B7	<i>Philaenus spumarius</i>	Morrolavieja	Undetermined
B8	<i>Philaenus spumarius</i>	Carrabaños	Undetermined
C1	<i>Philaenus spumarius</i>	Morrolavieja	Undetermined
C2	<i>Philaenus spumarius</i>	Morrolavieja	Undetermined
C3	<i>Neophilaenus lineatus</i>	Montitura	Undetermined
C4	<i>Philaenus spumarius</i>	Autol	Undetermined
C5	<i>Philaenus spumarius</i>	Tudelilla	Undetermined
C6	<i>Neophilaenus lineatus</i>	Morrolavieja	Undetermined
C7	C+	Qualiplante	30,61061096
C8	C+	Brasil	13,96340561

Taula 3: Controls negatius de Qualiplante, controls positius i mostres analitzades amb PCR real time a la figura 14 amb el cycle d'amplificació

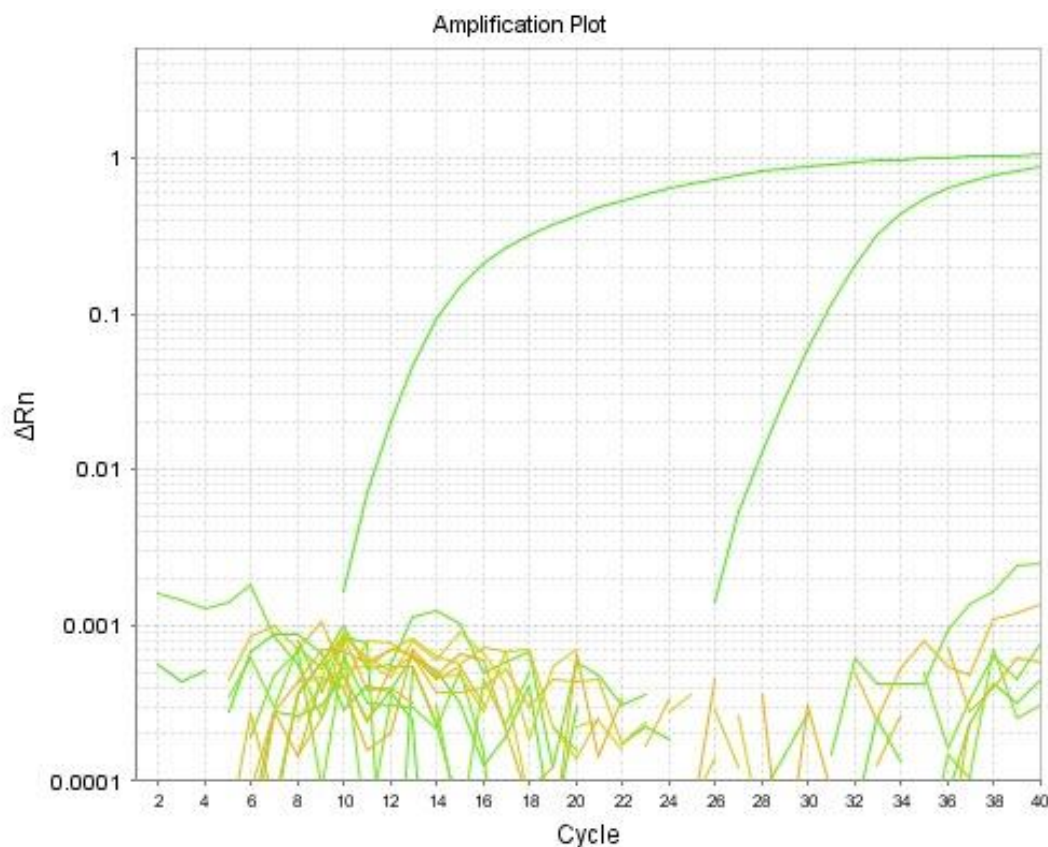


Figura 22: Resultat de la PCR a temps real de diferents mostres de *P.spumarius*, *N.lineatus* i Controls positius de Brasil i Qualiplante (taula 3)

La figura 14 es el resultat que es va obtenir de realitzar la PCR real time amb els vector de *X. fastidiosa* de la taula 3, únicament es van obtenir dos positius, el del kit Qualiplante que es detecta a 30,6 cicles i el de Brasil a 13,96 cicles, es a dir, el control positiu de Brasil conté molta més quantitat de DNA que el que ens proporciona el kit. Aquest positiu (DNA de planta infectada) va ser enviat directament des de Brasil (Universitat de Sao Paulo).



**4.3. Objectiu 3: Realització d'una prospecció en cultius d'olivera, vinya, jardins, centres de jardineria i viviers de plantes ornamentals, tant d'espècies que poden mostrar símptomes com d'altres que puguin ser hostes del bacteri i a vegades asimptomàtiques com *Polygala myrtifolia*, *Spartium junceum* i *Nerium oleander*, entre d'altres.**

Es van analitzar 180 mostres vegetals, 60 d'olivera, 60 de vinya i 60 d'ornamentals, mitjançant PCR clàssica, per tal de determinar la presència de *X. fastidiosa* en alguna de elles, com ha passat amb el insectes no es va trobar cap mostra positiva.

<b>Espècie</b>	<b>Varietat</b>	<b>Número</b>	<b>Localitat</b>	<b>Resultat</b>
<b>Olivera</b>	Arbequina	10	Reus	negatiu
<b>Olivera</b>	varies	10	GranjaYemasol. Reus	negatiu
<b>Olivera</b>	Arbosana	10	Reus	negatiu
<b>Olivera</b>	varies	16	Germoplasma Reus	negatiu
<b>Olivera</b>	Forastera	5	Cantalobos	negatiu
<b>Olivera</b>	Sevillana	5	Coves Barbera	negatiu
<b>Olivera</b>	Imperial	2	Reus	negatiu
<b>Olivera</b>	Soliva	2	Reus	negatiu
<b>Olivera</b>	Total	60		negatiu

Taula 4: Espècie, varietat , número, localitat i resultat de les oliveres analitzades a la prospecció



Espècie	Varietat	Número	Localitat	Resultat
Vinya	Chardonay	5	vilafranca del penedes	negatiu
Vinya	Perellada	5	vilafranca del penedes	negatiu
Vinya	Tempranillo	5	Gandesa	negatiu
Vinya	Shira	5	Gandesa	negatiu
Vinya	xarel·lo	5	Alella	negatiu
Vinya	cabernet-sauvignour	5	Alella	negatiu
Vinya	xarel·lo	5	Sant Sadurní	negatiu
Vinya	Macabeu	5	Sant Sadurní	negatiu
Vinya	Macabeu	5	Bonavista	negatiu
Vinya	Chardonnay	5	Perelada	negatiu
Vinya	Garnatxa	5	Gandesa	negatiu
Vinya	Varies	5	vilafranca del penedes	negatiu
Vinya	Total	60		negatiu

Taula 5: Espècie, varietat , número, localitat i resultat de les vinyes analitzades a la prospecció

Espècie	Varietat	Núm	Localitat	Resultat
Ornamental	Polygala myrtifolia	10	Cabrils mercat de la flor	negatiu
Ornamental	Polygala myrtifolia	10	Jardins Cabrils	negatiu
Ornamental	Spartium junceum	10	Cabrils mercat de la flor	negatiu
Ornamental	Spartium junceum	10	Jardins Cabrils	negatiu
Ornamental	Nerium oleander	10	Cabrils mercat de la flor	negatiu
Ornamental	Nerium oleander	10	Jardins Cabrils	negatiu
Ornamental	Total	60		negatiu

Taula 6: Espècie, varietat , número, localitat i resultat de les plantes ornamentals analitzades a la prospecció

#### 4.4. Objectiu 4: Dinàmica poblacional de *Philaenus spumarius* i identificació de plantes silvestres que puguin ser hostes d'aquest insecte.

##### Dinàmica poblacional de *Philaenus spumarius* a la riera de Cabrils

*Philaenus spumarius* es l'únic i principal vector demostrat, que es coneix a Europa, degut a això es va realitzar un seguiment de la dinàmica poblacional d'aquest a la riera de Cabrils. Es varen comparar les dates d'aparició d'aquesta espècie amb les que resultarien d'aplicar el model predictiu per acumulació de graus dia de Zajac (1989), per tal de validar aquest model (Annex B). El model ens proporcionava una aproximació de l'acumulació de graus dies que necessiten els insectes per poder arribar a la maduresa i sortir del niu, és a dir, convertir-se en vectors potencials del bacteri. Un cop identificats els nius i determinada la data d'aparició teòrica del primer adult (2 de maig), es van realitzar aspiracions setmanals des de una setmana abans de la data prevista (25 d'abril), tot el mes de maig i fins a principis de juny, per veure com evolucionava la població d'individus i si es confirmava la data d'aparició del primer individu donada pel model teòric.

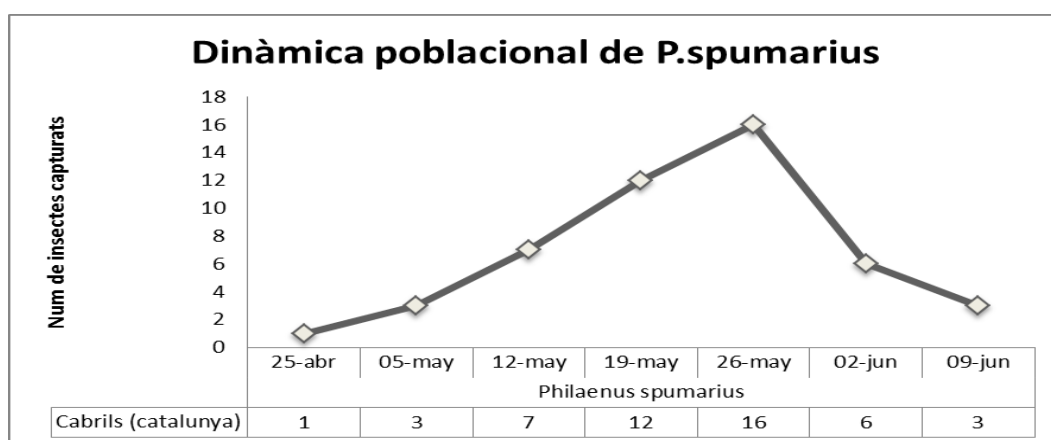


Figura 23: Dinàmica poblacional de *P.spumarius* a Cabrils

La dinàmica poblacional de *Philaenus* únicament pertany a l'any 2016, totes les mostres anteriors han estat rebutjades, ja que no segueixen el protocol d'aspiracions explicat anteriorment als materials i mètodes. El primer individu va ser capturat el 25 d'abril una setmana abans de l'estimada, a partir d'aquest punt la població de *P. spumarius* no va deixar d'augmentar setmanalment fins arribar al 26 de maig, on s'estableix el màxim de captures realitzades a la

localització (16 individus), posteriorment el nombre de captures descendeix progressivament (Gràfic 3)

### Identificació de plantes silvestres hostes del *Philaenus* i abundància de l'insecte en cadascuna d'elles

A la taula 9 es detallen les espècies silvestres en les que es van capturar individus de *P. spumarius*, així com l'abundància de plantes amb nius. Aquest llistat pertany a les localitats de Vallbona de les Monges, Caldes de Montbui, Sant Boi de Llobregat, Cabrils i Gadesa.

Família	Espècie	Localitat	
		Sant Boi	Cabrils
<b>Compostes</b>	<i>Sonchus oleraceus</i>	+++	+++
	<i>Sonchus arvensis</i>		+
	<i>Sonchus asper</i>		+
	<i>Sonchus tenerrimus</i>	+	+
	<i>Cirsium arvense</i>		+
	<i>Urospermum delechampii</i>	++++	
	<i>Dittrichia viscosa</i>	+	
<b>Crucíferes</b>	<i>Erucastrum nasturtiifolium</i>		+
<b>Gramínies</b>	<i>Bromus</i> sp.		+
	<i>Arundo donax</i>		+
	diverses gramínies	+	+
<b>Rubiàcies</b>	<i>Gallium aparine</i>		+
<b>Papilionàcies</b>	<i>Anthirrhinum majus</i>		+
	<i>Medicago falcata</i>		++
	<i>Medicago sativa</i>	+	
	<i>Medicago polymorpha</i>	+	
	<i>Medicago orbycularis</i>	+	
	<i>Psoralea bituminosa</i>		+
<b>Cariofil·làcies</b>	<i>Silene vulgaris</i>		+++
	<i>Scabiosa atropurpurea</i>	++++	++++
<b>Boraginàcies</b>	<i>Ecchium vulgare</i>		+
<b>Euforbiàcies</b>	<i>Mercurialis annua</i>		+
<b>Plantaginàcies</b>	<i>Plantago lanceolata</i>	+	+
<b>Papaveràcies</b>	<i>Roemeria hybrida</i>		+
<b>Umbel·líferes</b>	<i>Phoeniculum vulgare</i>	++	++
<b>Rosàcies</b>	<i>Sanguisorba minor</i>	+++	

Taula 7: Plantes silvestres hostes del *Philaenus* i abundància de l'insecte

		Localitat		
Família	Espècie	Vallbona de les Monges	Caldes de Montbui	Gandesa
<b>Compostes</b>	<i>Sonchus oleraceus</i>		+	+
	<i>Sonchus arvensis</i>			
	<i>Sonchus asper</i>			
	<i>Sonchus tenerrimus</i>		+	
	<i>Cirsium arvense</i>			
	<i>Urospermum delectans</i>			
	<i>Dittrichia viscosa</i>			
<b>Crucíferes</b>	<i>Erucastrum nasturtiifolium</i>	+	+	+
<b>Gramínies</b>	<i>Bromus sp.</i>			
	<i>Arundo donax</i>			
	diverses gramínies	+	+	
<b>Rubiàcies</b>	<i>Gallium aparine</i>			
<b>Papil·lionàcies</b>	<i>Anthirrhinum majus</i>			
	<i>Medicago falcata</i>			
	<i>Medicago sativa</i>	+	+	+
	<i>Medicago polymorpha</i>			
	<i>Medicago orbicularis</i>			
	<i>Psoralea bituminosa</i>			
<b>Caprifoliàcies</b>	<i>Silene vulgaris</i>			
	<i>Scabiosa atropurpurea</i>	+	+	+
<b>Boraginàcies</b>	<i>Ecchium vulgare</i>			
<b>Euforbiàcies</b>	<i>Mercurialis annua</i>			
<b>Plantaginàcies</b>	<i>Plantago lanceolata</i>			
<b>Papaveràcies</b>	<i>Roemeria hybrida</i>			
<b>Umbel·líferes</b>	<i>Phoeniculum vulgare</i>			
<b>Rosàcies</b>	<i>Sanguisorba minor</i>	+	+	+

Taula 8: plantes silvestres hostes del *Philaenus* i abundància de l'insecte

Com es pot observar a les Taules 8 i 9 s'han identificat 12 famílies i 26 espècies diferents que poden ser hostes del vector. Les espècies les hem classificat per localitat i per abundància alhora de ser hostes, molt puntual: +, puntual: ++, comú: +++ i finalment molt abundant: +++++. Segons la localitat, el insectes tenen més afinitat per un hoste que per un altre, però, hi ha espècies que podem dir que són comunes arreu, com per exemple: *Sonchus oleraceus*, *Medicago sativa*, *Scabiosa atropurpurea*, *Sanguisorba minor* i diverses gramínies.

## 5. Discussió

La prospecció realitzada a la Península de vectors potencials de *X. fastidiosa*, ha indicat la presència de 5 espècies que podrien ser potencials vectors del bacteri segons indica l'EFSA, aquestes espècies són: *Aphrophora* sp., *Cercopis* sp., *Cicadella viridis*, *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus* sp., d'altra banda no s'han capturat les 5 espècies a la vegada a cap comunitat. L'espècie més abundant a tot el territori ha estat *P. spumarius*, principal vector de la malaltia a Itàlia (Saponari et al. 2014), amb gairebé el 72% del volum de mostres. Aquesta mateixa espècie ha estat citada a Nord America com a vector del bacteri en vinya, encara que menys efectiu que *Homalodisca coagulata* i altres (Davis et al., 1978). El vector del bacteri està present a totes les localitats on s'ha realitzat l'estudi, per tant, podem dir que en cas que el bacteri fos introduït a Catalunya o a alguna part de la Península s'ha evidenciat el perill de disseminació del mateix. Les comunitats autònomes on s'ha capturat més aquest vector han estat País basc (Rioja alavesa) i Catalunya.

La prospecció realitzada a diferents àrees de Catalunya i la Península, amb la finalitat de determinar la presència de *X. fastidiosa*, ha indicat l'absència del bacteri en totes les mostres analitzades mitjançant la tècnica PCR, ja sigui de punt final o real time. Un 85% de les mostres d'insectes varen ser analitzades per PCR punt final i el 63% per PCR a temps real, això va ésser donat per la diferència econòmica d'una i altra. El 100% de les mostres vegetals van ser analitzades mitjançant PCR de punt final. Aquestes tècniques han estat sensibles i han permès la detecció del control positiu fins dilucions de  $10^{-6}$  al igual que en altres estudis (Francis et al; 2006; Harper et al. 2010).

La dinàmica poblacional de *P. spumaris* ha mostrat que els primers individus apareixen a finals d'abril capturant-se el màxim d'individus adults al 26 de maig, per tant, si acceptem un marge de error de  $\pm 6$  dies, podem dir que el model descrit al article de Zajac (1989), és vàlid per la predicció de l'aparició dels primers individus adults, basat en l'acumulació de graus dies.

Per finalitzar s'han identificat 12 famílies i 26 espècies diferents de plantes silvestres que poden ser hostes del vector, aquests hostes s'han classificat per localitat i per abundància, segons la localitat els insectes tenen més afinitat per un hoste que per un altre, però els més abundants

han estat *Sonchus oleraceus*, *Medicago sativa*, *Scabiosa atropurpurea*, *Sanguisorba minor* i diverses gramínies, les localitats estudiades van ser les de Vallbona de les Monges, Caldes de Montbui, Sant Boi de Llobregat, Cabrils i Gadesa. Les espècies de *Medicago* spp. i *Sonchus oleraceus* estan descrites com a hostes del vector per Hoffman GD & McEvoy PB (1985a), de les altres espècies no s'ha trobat bibliografia que relacioni les plantes amb el vector. Observant el llistat de plantes hostes de *P. spumarius*, podem dir que el vector té predilecció per plantes herbàcies bianuals o vivaces, aquestes plantes comencen el seu creixement a la primavera i ho fan molt ràpidament, per tant el seu flux de nutrients a través del xilema es abundant i constant per aconseguir aquest creixement, cosa que beneficia enormement als insectes xucladors de xilema com *P. spumarius*.

## 6. Conclusions

1. S'han identificat espècies pertanyents als 5 gèneres que podrien ser transmissores de *X. fastidiosa* a diferents àrees de la Península Ibèrica. Aquestes espècies són *Aphrophora* sp., *Cercopis* sp., *Cicadella viridis*, *Philaenus spumarius*, *Neophilaenus* sp.
2. Les comunitats on hi ha més abundància de vectors potencials són: País basc (Rioja alvesa) i Catalunya
3. A cap localitat s'han trobat al mateix temps les 5 espècies.
4. A Catalunya l'espècie més abundant ha estat *P. spumarius* i on s'ha trobat més abundància és a Vallbona de les monges .
5. No s'han identificat insectes ni plantes positives ni per PCR de punt final, ni per PCR a temps real.
6. La dinàmica poblacional de *P. spumarius* ha mostrat que els primers individus apareixen a finals d'abril capturant-se el màxim d'individus adults al 26 de maig
7. "El model fenològic de *P. Spumarius* en maduixa elaborat per Zajac (1989), s'ajusta per *P. Spumarius* en *Sonchus oleraceus*.
8. Els principals hostes de *P. spumarius* han estat, *Sonchus oleraceus*, *Medicago sativa*, *Scabiosa atropurpurea*, *Sanguisorba minor* i diverses gramínies
9. En cas de que el bacteri fos introduït a Catalunya s'ha evidenciat el perill de disseminació del mateix, ja que l'insecte vector causant de l'epidèmia a Itàlia està present a totes les zones estudiades en aquest treball.

## 7. Bibliografía

- Almeida, R.P.P., 2007. Glassy-winged sharpshooter transmission of *Xylella fastidiosa* to plants. *Proc. Hawaii Entomol. Soc.* 39, 83-86.
- Almeida, R.P.P., Backus, E.A., 2004. Stylet penetration behaviors of *Graphocephala atropunctata* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae): EPG waveform characterization and quantification. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97, 838-851.
- Amanifar, N., Taghavi, M., Izadpanah, K., Babaei, G., 2014. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathol. Mediterr.* 53, 318-327.
- Bates J.A, Taylor E.J.A., Kenyon D.M., Thomas J.E.. 2001. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology* 2(1), 49-57.
- Bech J., Torres, E., Laviña, A., Sabaté, J., Batlle, A. 2010. Detección de Fitoplasmas del grupo 16Sr-X, mediante PCR a tiempo real y PCR-nido. XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Vitoria, Septiembre de 2010.
- Bull, C.T., Coutinho, T.A., Denny, T.P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Li, X., Saddler, G.S., Scortichini, M., Stead, D.E., Takikawa, Y., 2014. List of new names of plant pathogenic bacteria (2011-2012). *J. Plant Pathol.* 96, 223-226.
- Chimel, S. M., and M. Curtis Wilson. 1979. Estimation of the lower and upper developmental threshold temperatures and duration of the nymphal stages of the meadow spittlebug, *Philaenus spumarius*. *Environ. Entomol.* 8: 682-685
- Christensen N.M., Nicolaisen M., Hansen M., Schulz A., 2004.- Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging.- *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17, 1175-1184
- Davis, M.J., Purcell, H.A., Thompson, S.V., 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199, 75-77.
- De Miranda, M.P., Lopes, J.R.S., Do Nascimento, A.S., Dos Santos, J.L., Cavichioli, R.R., 2009. Survey of sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae) associated with *Xylella*



fastidiosa transmission in Citrus groves of the North Coast of Bahia State. Neotrop. Entomol. 38, 827-U825.

- EFSA, Panel on Plant Health (PLH), European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on the risk to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction, EFSA Journal 2015;13(1):3989.
- Filion M., St-Arnaud M., Jabaji-Hare S.H., 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. Journal of Microbiological Methods 53: 67-76.
- Francis, M., Lin, H., Cabrera-La Rosa, J., Doddapaneni, H., Civerolo, E.L., 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. Eur. J. Plant Pathol. 115, 203-213.
- Freitag, J.H., 1951. Host range of Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. Phytopathology 41, 920-934.
- García-Chapa M., Sabaté J., Laviña A., Batlle A., 2005.- Role of *Cacopsylla pyri* in the epidemiology of pear decline in Spain.- European Journal of Plant Pathology, 111: 9-17.
- Giampetruzzi, A., Chiumenti, M., Saponari, M., Donvito, G., Italiano, A., Loconsole, G., Boscia, D., Cariddi, C., Martelli, G.P., Saldarelli, P., 2015. Draft genome sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO strain. Genome Announc 3, e01538-01514.
- Hill, B.L., Purcell, A.H., 1995. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. Phytopathology 85, 209-212.
- Hoffman GD & McEvoy PB (1985a) Mechanical limitations on feeding by meadow spittlebugs *Philaenus spumarius* (Homoptera: Cercopidae) on wild and cultivated host plants. *Ecological Entomology* 10: 415-426.
- Holzinger W.E., Kammerlander I. & Nickel H. 2003: The Auchenorrhyncha of Central Europe. Die Zikaden Mitteleuropas. Fulgoromorpha, Cicadomorpha excl. Cicadellidae. Brill, Leiden-Boston, 31-37
- Hopkins, D.L., 1985. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of the bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. Phytopathology 75, 713-717.

- [ipm.ucanr.edu](http://ipm.ucanr.edu). (2016). *UC IPM Phenology Model Database: Meadow Spittlebug*. [online] Available at: [http://ipm.ucanr.edu/PHENOLOGY/ma-meadow\\_spittlebug.html](http://ipm.ucanr.edu/PHENOLOGY/ma-meadow_spittlebug.html) [Accessed 22 Jun. 2016].
- Jarausch, W., Peccerella, T., Schwind, N., Jarausch, B., Krezal, G. 2004. Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Horticulturae* 657, 415-420
- Lees A.K., Cullen D.W., Sullivan L., Nicolson M.J. 2002. Development of conventional and quantitative real-time PCR assay for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology-Oxford*. 51 (3), 293-302.
- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasheri, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M.R., Trisciuzzi, N., Valentini, F., Savino, V., Saponari, M., 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *J. Plant Pathol.* 96, 7-14.
- Marzachi C., Bosco D. 2005. Relative quantification of Chrysanthemum yellows (16Srl) phytoplasma in its plant and insect host using real-time polymerase chain reaction. *Molecular Biotechnology* 30:117-127.
- Marzachi C., Bosco D. 2005. Relative quantification of Chrysanthemum yellows (16Srl) phytoplasma in its plant and insect host using real-time polymerase chain reaction. *Molecular Biotechnology* 30:117-127.
- Mumford R.A., Walsh K., Barker I., Boonham N. 2000. Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*. 90: 448-453.
- Nunney, L., Vickerman, D.B., Bromley, R.E., Russell, S.A., Hartman, J.R., Morano, L.D., Stouthamer, R., 2013. Recent evolutionary radiation and host plant specialization in the *Xylella fastidiosa* subspecies native to the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2189-2200.
- Oliveira A.C., Vallim M.A., Semighini, C.P., Araújo W.L., Gustavo H.G., Machado M.A., 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 92, 1048-1054.
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M., 2004. Real-time RT-PCR for quantitative detection of Plum pox virus. *Acta Horticulturae* 657.

- Purcell, A.H., Finlay, A., 1979. Evidence for non-circulative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology* 69, 393–395.
- Redak, R.A., Purcell, A.H., Lopes, J.R., Blua, M.J., Mizel, R.F.r., Andersen, P.C., 2004. The biology of Xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 243-270.
- Retchless, A.C., Labroussaa, F., Shapiro, L., Stenger, D.C., Lindow, S.E., Almeida, R.P., 2014. Genomic insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect hosts. In: Heidelberg, S.B. (Ed.), *Genomics of Plant-Associated Bacteria* pp. 177-202.
- Rodas, V., 1994. Convivencia com a clorose variegada dos citros. *Laranja* 15, 129-134.
- Ruralcat.net. (2016). Ruralcat. La comunitat virtual agroalimentària i del món rural - Dades Agrometeorològiques obtingudes a partir de les dades de la Xarxa d'Estacions Meteorològiques Automàtiques. [online] Available at: [https://www.ruralcat.net/web/guest/agrometeo.estacions?p\\_p\\_id=234&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-3&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_234\\_struts\\_action=%2Fadassistemas%2Fagrometeo%2Festacio](https://www.ruralcat.net/web/guest/agrometeo.estacions?p_p_id=234&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-3&p_p_col_count=1&_234_struts_action=%2Fadassistemas%2Fagrometeo%2Festacio) [Accessed 22 Jun. 2016].
- Saponari M., Boscia F., Nigro F., Martelli, G.P. 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy) *Journal of Plant Pathology* 95: 659-668.
- Saponari, M., Loconsole, G., Cornara, D., Yokomi, R.K., De Stradis, A., Boscia, D., Bosco, D., Martelli, G.P., Krugner, R., Porticelli, F., 2014b. Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *J. Econ. Entomol.* 107, 1316-1319.
- Severin, H.H.P., 1949. Transmission of the virus of Pierce's disease by leafhoppers. *Hilgardia* 19, 190–202.
- Severin, H.H.P., 1950. Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus. II. Life history and virus transmission. *Hilgardia* 19, 357-382.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M. and Chang, C.J., 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *Multiplex* and *X. fastidiosa* subsp. *Pauca*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 290-300. Erratum in: *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 763.

- Su, C.-C., Chang, C.J., Chang, C.-M., Shih, H.-T., Tzeng, K.-C., Jan, F.-J., Kao, C.-W., Deng, W.-L., 2013. Pierce's disease of grapevines in Taiwan: Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology* 161, 389-396.
- Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.-Y., Weisburg, W.G., Mandelco-Paul, L., Brenner, D.J., 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37.
- Young, D.A., 1968. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 1. Proconiini. *Bulletin of the United States National Museum, Washington* 261, 1-287.
- Zajac, M. A., F. R. Hall, and M. Curtis Wilson. 1989. Heat unit model for the development of meadow spittlebug (Homoptera: Cercopidae) on strawberry. *Environ. Entomol.* 18: 347-350
- Zhang, J.X., Lashomb, J., Gould, A., Hamilton, G., 2011. Cicadomorpha insects associated with bacterial Leaf Scorch infected oak in Central New Jersey. *Environ. Entomol.* 40, 1131-1143.

## 8. Annexes

### 8.1. Annex A. Sèrie de dades experimentals

Insectes					
Espècie	Num. Most.	Num. insec.	Localitat	Xylella	data
<b><i>Aphrophora</i></b>	B1250	2	Arenzana (La Rioja)	negatiu	30-may
<b><i>Aphrophora</i></b>	B1267	1	Carrabaños (Alava)	negatiu	30-may
<b><i>Aphrophora</i></b>	IP984	2	Segovia	negatiu	30-may
<b><i>Aphrophora</i></b>	IP985	3	Segovia	negatiu	30-may
<b><i>Aphrophora</i></b>	H798	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	30-may
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1637	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	13-jun
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1661	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	08-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1669	4	Estadilla (Aragon)	negatiu	08-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1672	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	20-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1674	2	Estadilla (Aragon)	negatiu	20-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1759	2	Estadilla (Aragon)	negatiu	20-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1768	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	20-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1778	2	Estadilla (Aragon)	negatiu	12-jun
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1973	3	Estadilla (Aragon)	negatiu	12-jun
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1979	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	12-jun

<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1984	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	12-jun
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	H573	2	Vallbona (Catalunya)	negatiu	19-jun
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1648	1	Vero (Aragon)	negatiu	30-may
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1649	7	Vero (Aragon)	negatiu	30-may
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1651	1	Vero (Aragon)	negatiu	30-may
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1654	3	Vero (Aragon)	negatiu	30-may
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1659	3	Vero (Aragon)	negatiu	17-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1686	1	Vero (Aragon)	negatiu	10-jul
<b><i>Cercopis intermedia</i></b>	B1959	1	Vero (Aragon)	negatiu	03-jul
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	B1078	8	Arenzana (La Rioja)	negatiu	26-jun
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	B1082	1	Arenzana (La Rioja)	negatiu	26-jun
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	B1248	2	Arenzana (La Rioja)	negatiu	26-jun
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	H438	1	Arenzana (La Rioja)	negatiu	11-jun
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	H442	1	Arenzana (La Rioja)	negatiu	11-jun
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	H449	2	Arenzana (La Rioja)	negatiu	11-jun
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	B1084	1	Cardenas (La Rioja)	negatiu	28-may
<b><i>Cicadella viridis</i></b>	H431	1	Cardenas (La Rioja)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1252	2	Arenzana (La Rioja)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1290	2	Carrabaños (Alava)	negatiu	28-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1306	1	Carrabaños (Alava)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1346	1	Carrabaños (Alava)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1375	1	Carrabaños (Alava)	negatiu	17-may

<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B517	2	Carrabaños (Alava)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1776	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1904	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	08-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1904	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	11-jun
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1974	3	Estadilla (Aragon)	negatiu	28-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1988	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	28-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B2101	1	Monteagudo (Murcia)	negatiu	28-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B706	1	Montitura (Navarra)	negatiu	30-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1316	2	Morrolavieja (Alava)	negatiu	28-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B524	1	Morrolavieja (Alava)	negatiu	28-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H664	1	Tarragona(Catalunya)	negatiu	21-jun
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H988	1	Tarragona(Catalunya)	negatiu	21-jun
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H989	1	Tarragona(Catalunya)	negatiu	08-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H990	1	Tarragona(Catalunya)	negatiu	08-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H991	1	Tarragona(Catalunya)	negatiu	26-jun
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H992	1	Tarragona(Catalunya)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H663	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H848	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	08-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H884	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H953	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	17-may
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H972	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	14-jun
<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	H985	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	11-jun

<b><i>Neophilaenus lineatus</i></b>	B1678	2	Vero (aragon)	negatiu	11-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1080	1	Arenzana (La Rioja)	negatiu	11-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H439	1	Arenzana (La Rioja)	negatiu	21-sep
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H443	1	Arenzana (La Rioja)	negatiu	06-sep
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B754	1	Autol (La Rioja)	negatiu	03-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B829	1	Autol (La Rioja)	negatiu	09-ago
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H965	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	21-sep
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H966	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	03-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H967	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	21-sep
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H968	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	09-ago
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H969	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	03-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H970	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	07-ago
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H971	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	31-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H973	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	26-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H974	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	26-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H975	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	21-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H976	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	31-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H977	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	31-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H978	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	26-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H979	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	21-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H980	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	25-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H981	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	27-jun



<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H982	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	27-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H983	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	09-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H984	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	09-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H943	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	09-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H944	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	09-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H945	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	09-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H946	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	09-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H947	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	09-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H948	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	11-ago
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H949	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	05-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H950	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	26-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H951	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	20-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H952	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	09-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H953	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	08-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H954	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	08-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H955	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	14-mar
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H956	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	14-mar
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H960	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	14-mar
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H961	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	14-mar
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H962	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H963	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H964	1	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	05-abr

<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1083	3	Cardenas (La Rioja)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1088	1	Cardenas (La Rioja)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1204	1	Cardenas (La Rioja)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1213	1	Cardenas (La Rioja)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1241	3	Cardenas (La Rioja)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H432	1	Cardenas (La Rioja)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H510	1	Cardenas (La Rioja)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B531	1	Carrabaños (Alava)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B536	4	Carrabaños (Alava)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B538	1	Carrabaños (Alava)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B543	1	Carrabaños (Alava)	negatiu	05-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1662	2	Estadilla (Aragon)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1706	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	22-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1966	3	Estadilla (Aragon)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H 74	1	Estadilla (Aragon)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H560	2	Extremadura	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H987	1	Gandesa (catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H995	1	Gandesa (catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H996	1	Gandesa (catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2152	2	Montitura (Navarra)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B626	1	Montitura (Navarra)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B742	1	Montitura (Navarra)	negatiu	22-may

<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1273	2	Morrolavieja (Alava)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1275	2	Morrolavieja (Alava)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1276	1	Morrolavieja (Alava)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1282	1	Morrolavieja (Alava)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1289	4	Morrolavieja (Alava)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1291	8	Morrolavieja (Alava)	negatiu	03-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1292	4	Morrolavieja (Alava)	negatiu	03-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1364	3	Morrolavieja (Alava)	negatiu	03-jul
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1370	1	Morrolavieja (Alava)	negatiu	07-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B525	3	Morrolavieja (Alava)	negatiu	07-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B551	2	Morrolavieja (Alava)	negatiu	07-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B554	3	Morrolavieja (Alava)	negatiu	07-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H997	1	Sant boi (Catalunya)	negatiu	07-oct
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H998	1	Sant boi (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B787	1	Saso (Navarra)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B841	1	Saso (Navarra)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	IP770	1	Segovia	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	IP860	1	Segovia	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H662	1	Tarragona(Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2192	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2251	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H122	6	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may

<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H20	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H24	4	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H30	7	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H687	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H689	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H699	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H700	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H701	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H702	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H703	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H710	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H712	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H713	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H714	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H740	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H746	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H747	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H84	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	15-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H874	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H875	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H876	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H877	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may

<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H878	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H879	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H881	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H883	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	02-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H891	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	02-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H892	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	02-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H906	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	02-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H907	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	02-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H916	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	02-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H917	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H918	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	03-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H919	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H920	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H921	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H922	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H923	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H924	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H925	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H926	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	12-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H927	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	12-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H928	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	12-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H929	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	12-may

<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H930	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	12-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H931	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H932	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H933	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H934	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H935	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H936	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H937	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H938	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H939	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H940	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H941	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H942	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	04-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	H986	1	Vallbona (Catalunya)	negatiu	05-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1655	3	Vero (aragon)	negatiu	06-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1712	1	Vero (aragon)	negatiu	25-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B1960	3	Vero (aragon)	negatiu	25-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2045	6	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	04-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2089	3	Caldes de Montbui (Catalunya)	negatiu	19-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2098	1	Cabrils (catalunya)	negatiu	25-abr
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2150	3	Cabrils (catalunya)	negatiu	05-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2165	7	Cabrils (catalunya)	negatiu	12-may

<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2168	12	Cabrils (catalunya)	negatiu	19-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2175	16	Cabrils (catalunya)	negatiu	26-may
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2179	6	Cabrils (catalunya)	negatiu	02-jun
<b><i>Philaenus spumarius</i></b>	B2182	3	Cabrils (catalunya)	negatiu	09-jun

Taula 9: Dades experimentals insectes





## 8.2. Annex B. Programa d'ajust Graus-Dia

	DD(°F)	DD(°C)
<b>Eclosió ous</b>	216	120

Taula 10: Acumulació de graus dies necessaris per l'eclosió dels ous

Font: lpm.ucanr.edu, 2016

	DD(°F)	DD(°C)
<b>1er estadi nimfal</b>	277.2	154
<b>2on estadi nimfal</b>	185.4	103
<b>3er estadi nimfal</b>	181.8	101
<b>4rt estadi nimfal</b>	203.4	103
<b>5é estadi nimfal</b>	325.8	181

Taula 11: Acumulació de graus dies necessaris per cada etapa de desenvolupament

Font: lpm.ucanr.edu, 2016

## Dades agrometeorològiques



 Tornar al mapa

### Cabrils

(Últimes dades obtingudes el 22/06/2016 07:00)

Municipi	Cabrils	Temperatura	23,4 °C
UTM X, UTM Y	448018, 4596420	Precipitació	0,0 mm
Altitud	81 m	Velocitat escalar del vent a 2 m	0,6 m/s

Variables	Graus-dia	Hores-fred
-----------	-----------	------------

### Graus-dia

Aquesta eina serveix de complement per conèixer com influeix la temperatura actual i la seva evolució temporal en el temps que necessita una planta o una plaga per desenvolupar-se



Data inici	: 21/06/2016		Llindar mínim (°C)	: 2.8
Data fi	: 21/06/2016		Llindar màxim (°C)	: 26.7

Figura 24: Càlcul de la acumulació de graus dies

Font: Ruralcat.net, 2016

### 8.3. Annex C. Figures



Figura 25: Niu *Philaenus spumarius*

Font: Jordi Sabaté



Figura 26: Niu *Philaenus spumarius*

Font: Jordi Sabaté



Figura 27: Vinya afectada per *Xylella fastidiosa*

Foto: Dr A.S. Purcell .Univ Berkeley (California)



Figura 28: Nimfa *Philaneus spumarius*

Font: Jordi Sabaté



Figura 30: Nimfa *Philaneus spumarius*  
Font: Jordi Sabaté



Figura 29: Nimfa *Philaneus spumarius*  
Font: Jordi Sabaté





Figura 32: Nimfa *Philaneus spumarius*

Font: Jordi Sabaté



Figura 31: Niu *Philaneus spumarius*

Font: Jordi Sabaté





Figura 33: Niu *Philaenus spumarius*

Font: Jordi Sabaté



Figura 34: Trampa groga atmetller

Font: Jordi Sabaté



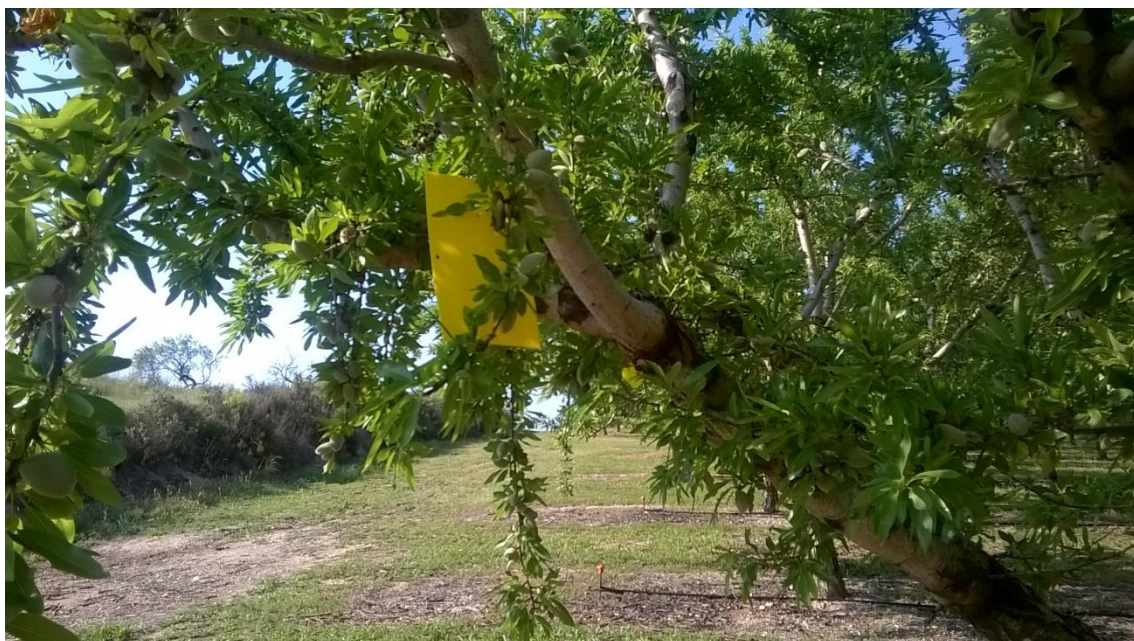


Figura 36: Trampa groga atmetller

Font: Jordi Sabaté

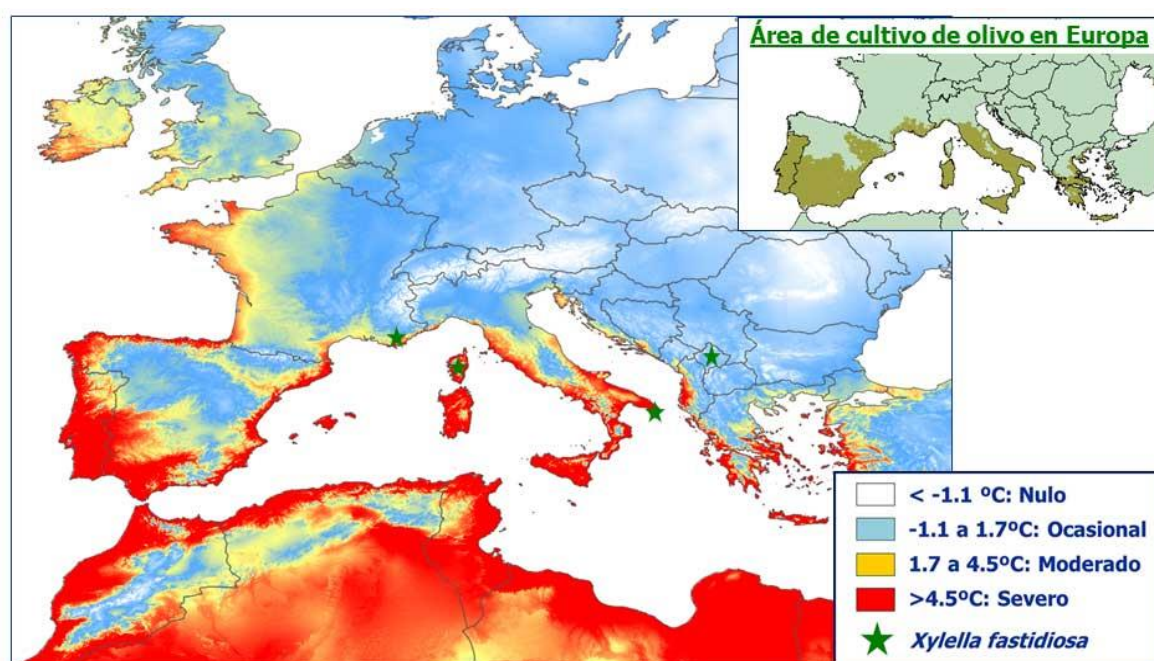


Figura 35: Potencial per a l'establiment de *Xylella fastidiosa* en funció de les temperatures mínimes hivernals segons criteri Fail & Purcell, 2001, Plant Disease 85: 1230-1234.





Figura 38: Homalodisca vitripennis



Figura 37: Síntomes de *Xylella fastidiosa* en oliveres severament afectats

Font: Interempresas, 2016

## 9. Índex Figures

Figura 1: Probabilitat de proliferació de la bacteria _____	8
Figura 2: <i>Xylella fastidiosa</i> _____	12
Figura 3: Variabilitat genètica subespècies _____	14
Figura 4: Situació mundial de <i>Xylella fastidiosa</i> _____	15
Figura 5: <i>P. spumarius</i> : forma typica /forma marginella _____	17
Figura 6: Aspiració _____	20
Figura 7: Classificació del ordre <i>Hemiptera</i> _____	20
Figura 8: Morfologia de les potes pertenyents al ordre de <i>Hemiptera</i> _____	21
Figura 10: Extracció de nervis amb un bisturí _____	22
Figura 9: Homogeneïtzació de mostra per detecció del bacteri en un homogeneïtzador Homex, utilitzant bosses Bioreba. _____	22
Figura 11: Seqüència d'actuació sonda tipus TaqMan. D'esquerra a dreta desnaturalització, hibridació i elongació, a la seqüència 3 la polimerasa topa amb la sonda hidrolitzant el fluorocrom i alliberant-lo del quencher. _____	28
Figura 12:- Amplificació mitjançant PCR a temps real (corbes d'amplificació de diferents dilucions) _____	28
Figura 13: <i>Aphrophora</i> sp. Font: Jordi Sabaté _____	31
Figura 14: <i>Cercopis intermedia</i> Font: Jordi Sabaté _____	32
Figura 15: <i>Cicadela viridis</i> Font: Jordi Sabaté _____	33
Figura 16: <i>Neophilaenus lineatus</i> Font: Jordi Sabaté _____	33

Figura 17: Imatge: <i>Philaenus spumarius</i> formes: typica, fasciata i marginella	34
Figura 18: Resultat de la prospecció realitzada a la Península Ibèrica per identificar espècies d'insectes pertanyents a gèneres de potencials vectors de <i>Xylella fastidiosa</i>	35
Figura 19: Resultat de la prospecció realitzada a Catalunya per identificar espècies d'insectes pertanyents a gèneres de potencials vectors de <i>Xylella fastidiosa</i>	36
Figura 20: Resultat de la electroforesi en gel d'agarosa dels productes obtinguts mitjançant PCR amb els primers HL5 i HL6	37
Figura 21: Detecció de <i>X. fastidiosa</i> mitjançant PCR a temps real (Harper et al. 2010; kit Qualiplante) Control positiu Qualiplante, dilució $10^{-2}$ , Control positiu Brasil 14 Ct, dilucions $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$ i $10^{-6}$ .	38
Figura 22: Resultat de la PCR a temps real de diferents mostres de <i>P.spumarius</i> , <i>N.lineatus</i> i Controls positius de Brasil i Qualiplante (taula 3)	39
Figura 23: Dinàmica poblacional de <i>P.spumarius</i> a Cabrls	42
Figura 24: Càlcul de la acumulació de graus diez	66
Figura 25: Niu <i>Philaenus spumarius</i>	67
Figura 26: Niu <i>Philaenus spumarius</i>	67
Figura 27: Vinya afectada per <i>Xylella fastidiosa</i>	68
Figura 28: Nimfa <i>Philaneus spumarius</i>	68
Figura 29: Nimfa <i>Philaneus spumarius</i>	69
Figura 30: Nimfa <i>Philaneus spumarius</i>	69
Figura 31: Niu <i>Philaenus spumarius</i>	70
Figura 32: Nimfa <i>Philaneus spumarius</i>	70

Figura 33: Niu <i>Philaenus spumarius</i> _____	71
Figura 34: Trampa groga atmetller _____	71
Figura 35: Potencial per a l'establiment de <i>Xylella fastidiosa</i> en funció de les temperatures mínimes hivernals segons criteri Fail & Purcell, 2001, Plant Disease 85: 1230-1234. _____	72
Figura 36: Trampa groga atmetller _____	72
Figura 38: <i>Homalodisca vitripennis</i> _____	73
Figura 37: Síntomes de <i>Xylella fastidiosa</i> en oliveres severament afectats _____	73

## 10. Índex Taules

Taula 1: Primers HL5/HL6 i sonda (Francis et al. 2006)	24
Taula 2: PCR punt final i RT realitzades	37
Taula 3: Controls negatius de Qualiplante, controls positius i mostres analitzades amb PCR real time a la figura 14 amb el cicle d'amplificació	38
Taula 4: Espècie, varietat , número, localitat i resultat de les oliveres analitzades a la prospecció	40
Taula 5: Espècie, varietat , número, localitat i resultat de les vinyes analitzades a la prospecció	41
Taula 6: Espècie, varietat , número, localitat i resultat de les plantes ornamentals analitzades a la prospecció	41
Taula 7: Plantes silvestres hostes del <i>Philaenus</i> i abundància de l'insecte	43
Taula 8: plantes silvestres hostes del <i>Philaenus</i> i abundància de l'insecte	44
Taula 9: Dades experimentals insectes	63
Taula 10: Acumulació de graus dies necessaris per l'eclosió dels ous	65
Taula 11: Acumulació de graus dies necessaris per cada etapa de desenvolupament	65

